

Institut für Biochemie der Medizinischen Fakultät Charité der Humboldt-Universität zu
Berlin

Dissertation

Strukturen von eEF3 und Sec61 als aktive ribosomale Liganden

Zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

im Fach Biologie, Spezialisierung Biochemie

eingereicht an der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I

der Humboldt-Universität zu Berlin

von

Thomas Becker

geb. 30.11. 1974 in Böblingen, Deutschland

Präsident der Humboldt-Universität zu Berlin in Vertretung Prof. Dr. Jürgen Prömel
Dekan der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I Prof. Thomas Buckhout, PhD

Gutachter:

1. Prof. Dr. A. Herrmann
2. Prof. Dr. K.P. Hoffmann
3. Prof. Dr. C. Spahn

eingereicht: 20.12.2005

Datum der Promotion: 24.04.2006

Zusammenfassung

Thema dieser Arbeit sind zwei zentrale biochemische Aspekte der Proteinbiosynthese, wobei das Ribosom eine zentrale Komponente darstellt: erstens wird ein spezieller Faktor des Elongationszyklus in Pilzen, eEF3, und zweitens der proteinleitende Kanal bei der kotranslationalen Proteintranslokation durch die Membran des endoplasmatischen Retikulums (ER) betrachtet.

Für die Elongation der Polypeptidkette benötigen alle Organismen zwei Elongationsfaktoren, die GTPasen eEF1A (EF-Tu in Prokaryoten) und eEF2 (EF-G in Prokaryoten). Bei *Fungi* wird noch ein dritter Elongationsfaktor, eEF3, benötigt. Dieser Faktor ist eine ATPase mit ABC-Kassetten-Domänen. Durch einen nicht bekannten Mechanismus stimuliert er in Gegenwart von ATP die eEF1A-abhängige Bindung von Aminoacyl-tRNA an die ribosomale A-Stelle. Es wurde vorgeschlagen, dass eEF3 die Freisetzung von deacylierter tRNA aus der ribosomalen E-Stelle ermöglicht, und dadurch über allosterische Kopplung die Affinität der A-Stelle für Aminoacyl-tRNA erhöht. In dieser Arbeit wird die Kryo-EM Struktur von ribosomengebundenem eEF3 bei 13,3 Å vorgestellt. Dabei zeigt sich eine völlig neue ribosomale Bindungsstelle für eEF3 von der aus tatsächlich die Affinität für tRNA in der ribosomalen E-Stelle moduliert werden kann. Mit Hilfe der Kristallstruktur von eEF3 wurde ein molekulares Modell für eEF3 in seiner funktionalen Konformation generiert, welches die strukturelle Basis für die Aktivität dieses ABC-Proteins im Kontext der Translation liefert.

Bei der kotranslationalen Translokation stellt der heterotrimere Sec61 $\alpha\beta\gamma$ -Komplex einen signalsequenzgesteuerten proteinleitenden Kanal (PCC) dar, der die Translokation eines sekretorischen Proteins durch, oder die Integration von Membranproteinen in die ER-Membran erlaubt. Es wird angenommen, dass der aktive proteinleitende Kanal im ribosomengebundenen Zustand aus einer oligomeren Struktur mit mehreren Kopien des Sec61-Heterotrimers besteht. Die Kristallstruktur eines inaktiven PCC zeigt jedoch nur ein einziges Heterotrimer (Monomer), das auch im aktiven Zustand funktional sein könnte. In dieser Arbeit wird eine Kryo-EM-Struktur des aktiven proteinleitenden Kanals im Komplex mit einem translatierenden Ribosom aus Hefe präsentiert, die die bislang detaillierteste Elektronendichtekarte für den PCC zeigt. Als charakteristisches Merkmal kann eine trichterförmige Pore auf der zytosolischen Seite visualisiert werden. Es wurden verschiedene molekulare Modelle für den aktiven Zustand in die Elektronendichte gedockt. Obwohl eine genaue molekulare Interpretation durch die Auflösung (12,3 Å) nach wie vor limitiert ist, erscheint es sehr wahrscheinlich, dass nur ein einziges, geöffnetes Sec61-Heterotrimer im aktiven Kanal vorliegt.

Schlagworte: Ribosom, Elongation, eEF3, E-Stelle, kotranslationale Translokation, Sec61, Kryo-Elektronenmikroskopie

Abstact

This work is dealing with two central biochemical processes in the biogenesis of a protein where the ribosome plays a key role, namely the elongation cycle during protein synthesis and co-translational protein translocation through the membrane of the endoplasmic reticulum (ER).

Protein synthesis requires two canonical elongation factors in all kingdoms. These are the GTPases eEF1A (EF-Tu in prokaryotes) and eEF2 (EF-G in prokaryotes). In *fungi*, a third elongation factor eEF3 is required, which is an ATPase belonging to the ABC protein family. This factor is essential for the binding of the aminoacyl-tRNA-eEF1A-GTP ternary complex to the A site of the ribosome and has been suggested to do so by facilitating the clearance of deacyl-tRNA from the ribosomal E-site. Here, the cryo-EM structure of the ATP-bound form of eEF3 in complex with a 80S ribosome from yeast is presented. It reveals that eEF3 binds the ribosome in the post-translocational conformation using a novel binding site from where the affinity for tRNA in the ribosomal E site can be easily modified. Using the crystal structure of eEF3, a molecular model for eEF3 was generated, which provides the structural basis for the activity of an ABC protein in the context of translation.

In co-translational translocation the trimeric Sec61-complex serves as a signal sequence-gated protein-conducting channel (PCC) which allows the translocation of a secretory protein through and the integration of a membrane protein into the lipid bilayer of the ER. Bound to a ribosome, the active PCC seems to have an oligomeric structure consisting of several copies of Sec61-trimers. The crystal structure of an inactive PCC, however, shows only a single heterotrimer (monomer) which could also be functional in the active state. Here, the cryo-EM structure of an active PCC in complex with a translating ribosome from yeast is presented, showing the hitherto most detailed electron density map for the PCC. The most characteristic feature is a funnel-shaped off-centered pore at the cytosolic side. Several models for the active state were docked into the EM-density. Although a precise molecular interpretation is limited by the resolution (12, 3 Å), a single copy of an opened Sec61-heterotrimer seems to be the most reasonable fit for the density.

Keywords: ribosome, elongation, eEF3, E-site, cotranslational translocation, Sec61, cryo-electron microscopy

Zusammenfassung	2
Abstract	4
Abkürzungen	9
1. Einleitung	11
1.1 Kryo-Elektronenmikroskopie und Einzelpartikelrekonstruktion	11
1.2 Überblick über Proteinbiosynthese, -sortierung und -translokation	13
1.3 Die Elongation der Translation	15
1.4 Ribosomale Komplexe mit Elongationsfaktoren	16
1.5 Der pilzspezifische Elongationsfaktor eEF3	20
1.5.1 Funktion von eEF3	20
1.5.2 Topologie von eEF3	21
1.5.3 Kristallstruktur von eEF3	23
1.5.4 Bindungsstellen zwischen von eEF3 und Ribosom	24
1.6 Fragestellung und Ziele im Zusammenhang mit eEF3	25
1.7 Das Translokon in der ER-Membran	26
1.8 Der trimere Sec61-Komplex	26
1.8.1 Topologie	26
1.8.2 Eigenschaften	27
1.8.3 Charakterisierung des PCC	28
1.8.4 Kryo-EM-Struktur des aktiven RNC-Sec61-Komplexes aus Hefe	28
1.8.5 Kristallstruktur des trimeren SecYE β -Komplexes	31
1.8.6 Modelle für den aktiven Zustand des PCC	33
1.9 Integration von Membranproteinen	34
1.9.1 Modelle für die Integration polytopischer Membranproteine	34
1.9.2 Substrate zu Reinigung von Insertionsintermediaten während der kotranslationalen Membranprotein-Integration	37
1.10 Fragestellung und Ziele im Zusammenhang mit dem trimeren Sec61-Komplex	38
2. Materialien und Methoden	40
2.1 Anzucht von Hefen (<i>S. cerevisiae</i>)	40
2.2 Molekularbiologische Methoden	40
2.2.1 DNA-Amplifikation durch PCR (<i>polymerase chain reaction</i>)	40
2.2.2 Oligonukleotide	41
2.2.3 Vektoren	43
2.2.4 Gelelution und Reinigung von DNA Fragmenten	43

2.2.5	Plasmidisolierung aus <i>E. coli</i>	43
2.2.6	DNA Fällung und Sequenzierung	43
2.2.7	Agarose- Gelelektrophorese	44
2.2.8	Transformation von <i>S. cerevisiae</i>	44
2.2.9	Generation verschiedener DPAP-B-Substrate für <i>in vitro</i> Translation	44
2.2.10	Generation von Opsin-Substraten verschiedener Länge	45
2.3	Proteinbiochemische Methoden	46
2.3.1	Aufschlussverfahren von Hefezellen	46
2.3.2	Herstellung zytosolischer S100-Extrakte und Vesikel rauher ER-Membranen	47
2.3.3	Herstellung von Hefe-Translationsextrakten (<i>yeast translation extract</i> , YTE)	47
2.3.4	<i>In vitro</i> Transkription	48
2.3.5	<i>In vitro</i> Translation (IVT)	48
2.3.6	Präparation von <i>ribosome nascent chains</i> (RNC)	49
2.3.7	Präparation von 80S-Ribosomen aus S100-Extrakt	50
2.3.8	Präparation von eEF3 aus S100-Extrakt	50
2.3.9	Reinigung des trimeren-Sec61-Komplex aus Hefe-Mikrosomen	51
2.3.10	<i>In vitro</i> Rekonstitution	52
2.3.11	Bindungstests	53
2.3.12	Proteaseprotektions-Experimente	54
2.3.13	Proteinfällung und SDS-PAGE	54
2.3.14	Western Blot Analyse	54
2.4	Kryo-Elektronenmikroskopie (Kryo-EM)	55
2.4.1	Herstellung von Grids für Kryo-EM	55
2.4.2	Mikroskopie am Tecnai Polara F30	56
2.5	Bildverarbeitung und 3D-Rekonstruktion	56
2.5.1	Berechnung von Powerspektren und Defokusbestimmung	56
2.5.2	Selektion der Partikel	56
2.5.3	Initiales Alignment der Partikel mit der <i>projection matching</i> Methode	57
2.5.4	3D-Rekonstruktion	58
2.5.5	Refinement	58
2.5.6	Hochauflösung ($< 10 \text{ \AA}$)	59
2.5.7	Sortierung	59
2.5.8	3D-Rekonstruktion des Hefe-DP120-RNC-Sec61-Komplexes	60
2.5.9	3D-Rekonstruktion des Hefe-eEF3-DP120-RNC-Komplexes	60

2.6	Molekulare Interpretation und Docking von Kristallstrukturen.....	61
2.6.1	Erstellung eines Modells für den ribosomengebundenen trimeren Sec61-Komplex.....	61
2.6.2	Erstellung eines Modells für ribosomengebundenes eEF3	62
3.	Ergebnisse	63
3.1	Herstellung eines funktionalen eEF3-Ribosomen Komplexes.....	63
3.1.1	Reinigung von 80S-Ribosomen und von RNCs.....	63
3.1.2	Reinigung von eEF3	63
3.1.3	Rekonstitution eines stabilen eEF3-Ribosomen-Komplexes für Untersuchungen mittels Kryo-EM	65
3.2	Kryo-EM-Struktur des eEF3-RNC-Komplexes	68
3.2.1	3D-Rekonstruktion, Sortierung und Auflösung	68
3.2.2	Übersicht über die Struktur des eEF3-RNC-Komplexes	68
3.2.3	Docking der Kristallstruktur und atomarer Modelle von eEF3.....	70
3.2.4	Die ribosomale Bindungsstelle von eEF3	71
3.2.5	Molekulare Kontakte von eEF3	72
3.2.6	Modell für den ribosomengebundenen Zustand von eEF3 in der offenen Konformation	74
3.2.7	Korrelation der Bewegung der Chromo-Domäne mit der Bewegung der L1-Protuberanz.....	77
3.3	Herstellung eines funktionalen RNC-Sec61-Komplexes.....	79
3.3.1	Präparation von Ribosomen mit naszierender Kette (RNCs) aus Hefe	79
3.3.2	Reinigung des trimeren Sec61-Komplexes aus Hefe und in <i>in vitro</i> Rekonstitution mit gereinigten DP120-RNCs.....	81
3.4	Kryo-EM und 3D-Rekonstruktion des DP120-RNC-Sec61-Komplexes.....	82
3.4.1	3D-Rekonstruktion von verschiedenen RNC-Sec61-Datensätzen.....	82
3.4.2	Sortierung des gesamten RNC-Sec61-Datensatzes.....	85
3.4.3	Struktur der isolierten Sec61-Elektronendichte	91
3.4.4	Docking von molekularen Modellen in die Kryo-EM-Dichte für Sec61	92
3.5	Substratoptimierung	95
3.5.1	Generierung eines Substrates zur Reinigung von Membraninsertions-Intermediaten <i>in vivo</i> mit Hilfe der <i>HAC</i> -mRNA	95
3.5.2	Herstellung von Opsin-Konstrukten verschiedener Längen	98

3.5.3	Reinigung von Ops146-RNCs und <i>in vitro</i> Rekonstitution mit gereinigtem trimeren Sec61-Komplex	101
4.	Diskussion	104
4.1	Der eEF3-RNC-Komplex.....	104
4.1.1	Bindung von eEF3 an das Ribosom an einer neuen Bindungsstelle: Interaktionen von HEAT- und die Chromo-Domäne.....	105
4.1.2	Kooperation und Kompetition mit anderen Elongationsfaktoren	107
4.1.3	eEF3 im Kontext mit dem Schaltermodell für ABC-Transporter	108
4.1.4	eEF3 als E-Stellen-Faktor	110
4.1.5	Erweiterter Elongationszyklus für die Proteinbiosynthese in Pilzen (<i>fungi</i>) .	112
4.1.6	Ist die ribosomale Bindungsstelle für eEF3 auch außerhalb der Translation in Pilzen bedeutsam?	114
4.1.7	Ausblick	115
4.2	Der RNC-Sec61-Komplex	116
4.2.1	Experimenteller Ansatz	117
4.2.2	Sortierung des DP120-RNC-Sec6	117
4.2.3	Docken atomarer Modelle in die Elektronendichte für den aktiven Sec61-Komplex	118
4.2.4	Ist Sec61 im aktiven Zustand ein Monomer?.....	119
4.3	Substrate zum Studium der Integration von Membranproteinen	121
4.4	Ausblick	122
4.4.1	Verbesserung der Auflösung des RNC-Sec61-Komplexes aus Hefe.....	122
4.4.2	Alternative Methoden, die Struktur des PCC zu lösen.....	122
	Danksagung.....	124
	Lebenslauf.....	125
	Publikationsliste	126
	Eidestättliche Erklärung:	128
	Literaturverzeichnis.....	129

Abkürzungen

Kryo-EM	Kryo-Eletronenmikroskopie
CTF	Kontrasttransferfunktion (<i>contrast transfer function</i>)
FSC	Fourier Shell Korrelation (<i>fourier shell correlation</i>)
ER	Endoplasmatisches Retikulum
eEF3	eukaryotischer Elongationsfaktor 3
ABC	ATP-Bindungs-Kassette (<i>ATP binding cassette</i>)
Aa-tRNA	Aminoacyl- <i>transfer</i> -RNA
ATP/GTP	Adenosintriphosphat/Guanosintriphosphat
ADP/GDP	Adenosindiphosphat/ Guanosintriphosphat
AMP-PNP	Adenylyl-Iminodiphosphat
PCC	proteinleitender Kanal (<i>protein conducting channel</i>)
TM-	Transmembran-
w/v	Gewicht pro Volumen (<i>weight per volume</i>)
v/v	Volumen pro Volumen (<i>volume per volume</i>)
IVT	<i>in vitro</i> Translation
Kd/Md	Kilodalton/Megadalton

HA	Hämagglutinin
OD	optische Dichte
U	<i>Units</i>
YPD	Vollmedium (<i>yeast peptone dextrose</i>)

1. Einleitung

1.1 Kryo-Elektronenmikroskopie und Einzelpartikelrekonstruktion

Viele Schlüsselfunktionen in der Zelle, wie z.B. DNA-Replikation, mRNA-Transkription, Proteinbiosynthese oder Proteinabbau finden an großen, makromolekularen Komplexen statt. Diese sind oft sehr groß und in ihrer Struktur flexibel. Deshalb erweist sich die Ermittlung der dreidimensionalen (3D-)Strukturen dieser Komplexe mit den klassischen Methoden wie Kernresonanzspektroskopie (NMR) oder Röntgenkristallographie (X-Ray) als sehr schwierig und in manchen Fällen unmöglich. Kryo-Elektronenmikroskopie (Kryo-EM) in Kombination mit Einzelpartikelrekonstruktion erwies sich in den letzten Jahren jedoch als sehr erfolgreiche Methode bei der Ermittlung von Strukturen dieser so genannten molekularen Maschinen bei Auflösungen unter einem Nanometer.

Bei der Kryo-EM wird Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) benutzt, um biologische Proben in einer dünnen Schicht aus vitrifiziertem Eis bei sehr niedrigen Temperaturen zu visualisieren (Dubochet, McDowell et al. 1983; Lepault, Booy et al. 1983). Bei dieser Technik wird die Probe im voll hydratisierten Zustand unter nahezu physiologischen Bedingungen erhalten.

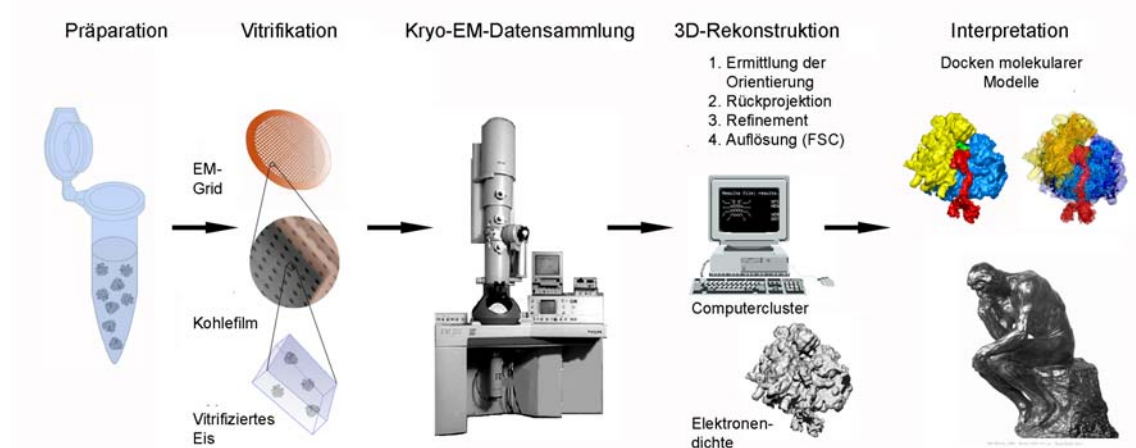


Abb. 1: Schema zur Strukturbestimmung mittels Kryo-EM und Einzelpartikelrekonstruktion. Details sind im Text beschrieben.

In Abb. 1 ist die Vorgehensweise bei der Strukturbestimmung durch Kryo-EM und Einzelpartikelrekonstruktion schematisiert. Am Anfang steht die Präparation einer homogenen Population von makromolekularen Komplexen, beispielsweise Ribosomen in

einer definierten Konformation mit gebundenem Liganden. Diese Proben werden dann auf einen Probenträger (EM-Grid) gebracht, der mit einem löchrigen Kohlefilm bedeckt ist. Überschüssige Probe wird dann durch Blotten mit Filterpapier entfernt und das Grid danach in flüssigem Ethan schockgefroren. Diese Prozedur geschieht unter Verwendung von Spezialgeräten (Guillotine) oder Robotern so schnell, dass das Eis hinterher in einem nicht-kristallinen, glasartig vitrifizierten Zustand ist. Die einzelnen Partikel befinden sich dann in zufälliger Anordnung in einer dünnen Schicht (30–100 nm) aus vitrifiziertem Eis. Als nächster Schritt folgt die Datensammlung am Mikroskop, das zumeist mit flüssigem Stickstoff (-180°C) gekühlt wird. Um Strahlenschäden zu vermeiden, werden die Daten unter Niedrigdosis-Bedingungen (5–40 Elektronen pro Sekunde und \AA^2) in einem Modus gesammelt, bei dem Zonen, von denen Aufnahmen gemacht werden sollen, nur bei der Aufnahme selber dem Elektronenstrahl ausgesetzt werden (Niedrigdosis-Modus). Um den Kontrast zu erhöhen, werden die Daten unterhalb der Fokusebene gesammelt, wodurch das Bild jedoch verzerrt wird. Diese Verzerrung wird im reziproken Raum durch die Kontrasttransferfunktion (CTF, *contrast transfer function*) beschrieben und muss bei der 3D-Rekonstruktion korrigiert werden. Da das Signal-Rausch-Verhältnis bei Einzelpartikeln sehr ungünstig ist, müssen sehr viele Daten akkumuliert werden. Um eine Auflösung von unter 12 \AA zu erreichen, müssen in der Regel 50 bis 200 Mikrographen gesammelt werden, auf denen jeweils ca. 500-1000 Bilder von Einzelpartikeln enthalten sind.

Was nun folgt, ist die computergestützte Rekonstruktion einer dreidimensionalen Struktur aus den Abbildungen der Einzelpartikel. Dazu werden die Mikrographen bei einer hohen Auflösung (1-3 \AA /Pixel) digitalisiert und nachfolgend die einzelnen Partikel selektiert. Die Bilder der Einzelpartikel entsprechen zweidimensionalen (2D-)Projektionen, welche jedoch alle 3D-Strukturinformationen des Partikels enthalten, die entlang der optischen Achse aufsummiert sind. Einer der wichtigsten Schritte bei der 3D-Rekonstruktion ist deshalb die Bestimmung der relativen Orientierung der Partikel, die Alignment genannt wird. Im Alignment werden die Projektionswinkel (Euler'sche Winkel) und die Translation der Projektion in der Ebene bestimmt. Für das Alignment gibt es mehrere Methoden, die davon abhängig sind, ob die Struktur *de novo* bestimmt werden muss, oder ob diese in erster Näherung schon bekannt ist, wie z.B. bei ribosomalen Komplexen.

Bei der Rückprojektion wird aus den alinierten Partikeln eine 3D-Struktur (Volumen) erzeugt. Diese Struktur kann dann wieder als Referenz für eine weitere Runde des Alignments verwendet werden. Die iterative Wiederholung von Alignments und Rückprojektionen wird Refinement genannt. Das Refinement wird so lange durchgeführt, bis sich die Auflösung der

Struktur nicht mehr verbessert. Um die Auflösung zu bestimmen, wird der Datensatz halbiert und die Korrelation zwischen den beiden Halbvolumina im reziproken Raum in Abhängigkeit von der Raumfrequenz bestimmt (FSC, *Fourier Shell Correlation*). Die Auflösung wird dabei bei einem FSC-Wert von 0,5, was ein Signal-Rausch-Verhältnis von 1:1 bedeutet, abgelesen. Der letzte Schritt ist die Interpretation der nach dem Refinement erhaltenen Elektronendichte. Oft ist es hierbei möglich, hoch aufgelöste Strukturen (X-Ray- und NMR-Strukturen oder daraus erhaltene Homologiemodelle) von einzelnen Komponenten in die Elektronendichte eines Multikomponentenkomplexes zu docken und diese in ihrem funktionalen Kontext zu platzieren.

1.2 Überblick über Proteinbiosynthese, -sortierung und -translokation

Die *de novo* Biosynthese von Proteinen findet im Zytosol der Zelle an makromolekularen Maschinen, den Ribosomen, statt. Ribosomale Partikel sind einige Megadalton (Md) groß und bestehen aus mehreren RNA-Molekülen, die mit 50 bis 80 Proteinen assoziiert sind. Während der Translation interagiert das Ribosom mit einer großen Anzahl an Translationsfaktoren, *messenger*-RNA (mRNA) und *transfer*-RNAs (tRNAs). Am Ribosom wird der genetische Code aus der mRNA-Sequenz in eine Proteinsequenz übersetzt (Dekodierung) und die Verknüpfung der Aminosäuren zu einem Polypeptid katalysiert (Peptidyltransfer). Prokaryotische 70S-Ribosomen sind ca. 2,7 Md groß und bestehen aus einer großen 50S-Untereinheit (50S-UE) und einer kleinen 30S-Untereinheit (30S-UE), wohingegen eukaryotische 80S-Ribosomen wesentlich größer sind (ca. 4,2 Md) und aus einer großen 60S-Untereinheit (60S-UE) und einer kleinen 40S-Untereinheit (40S-UE) bestehen. Die 40S-UE bindet die mRNA und enthält das Dekodierungszentrum, wo die Basentriplets (Codons) der mRNA mit den Anticodons von Aminoacyl-tRNAs (Aa-tRNAs) verglichen werden, während die große Untereinheit die Peptidyltransferaseaktivität beinhaltet. Die Austrittsstelle (*Exit*-Stelle) für die wachsende Peptidkette befindet sich an Ende eines Tunnels auf der gegenüberliegenden Seite der 60S-UE.

Viele Proteine haben einen anderen zellulären Bestimmungsort als das Zytosol und mehr als 40% müssen durch eine Membran geschleust oder in diese integriert werden, bevor sie an ihren Zielort gelangen. Diese Proteine haben Sortierungssignale (Blobel and Sabatini 1971), das sind charakteristische Signalsequenzen, nach denen sie eindeutig erkannt und zu ihren Bestimmungsorten gebracht werden. Man unterscheidet kotranslationale und posttranslationale Sortierungswege. Beim kotranslationalen Weg (Abb. 2) erkennt ein Signalerkennungspartikel (SRP) die Signalsequenz des naszierenden Polypeptids am Ribosom

und bringt diesen RNC-Komplex (*ribosome nascent chain-complex*) an die Membran. Dort wird dieser so genannte *Targeting-Komplex* (RNC-SRP-Komplex) vom SRP-Rezeptor (SR) erkannt und die naszierende Kette von *Docking-Komplex* (RNC-SRP-SR-Komplex) auf einen proteinleitenden Kanal (PCC, *protein-conducting channel*) übertragen und dort insertiert. Beim posttranslationalen Weg werden die Proteine im Zytosol vollständig synthetisiert, wobei molekulare Chaperone Fehlfaltung und Aggregation im Zytosol verhindern, und werden später unabhängig von SRP und SR an ihren Zielort gebracht. Nach der Translokation durch oder Integration in die Membran des endoplasmatischen Retikulums (ER) können weitere posttranslokationale Modifikationen durchgeführt werden, wie beispielsweise Glykosylierung durch die Oligosaccharyltransferase (OST) oder die Abspaltung des Signalpeptids durch den Signalpeptidase-Komplex (SPC).

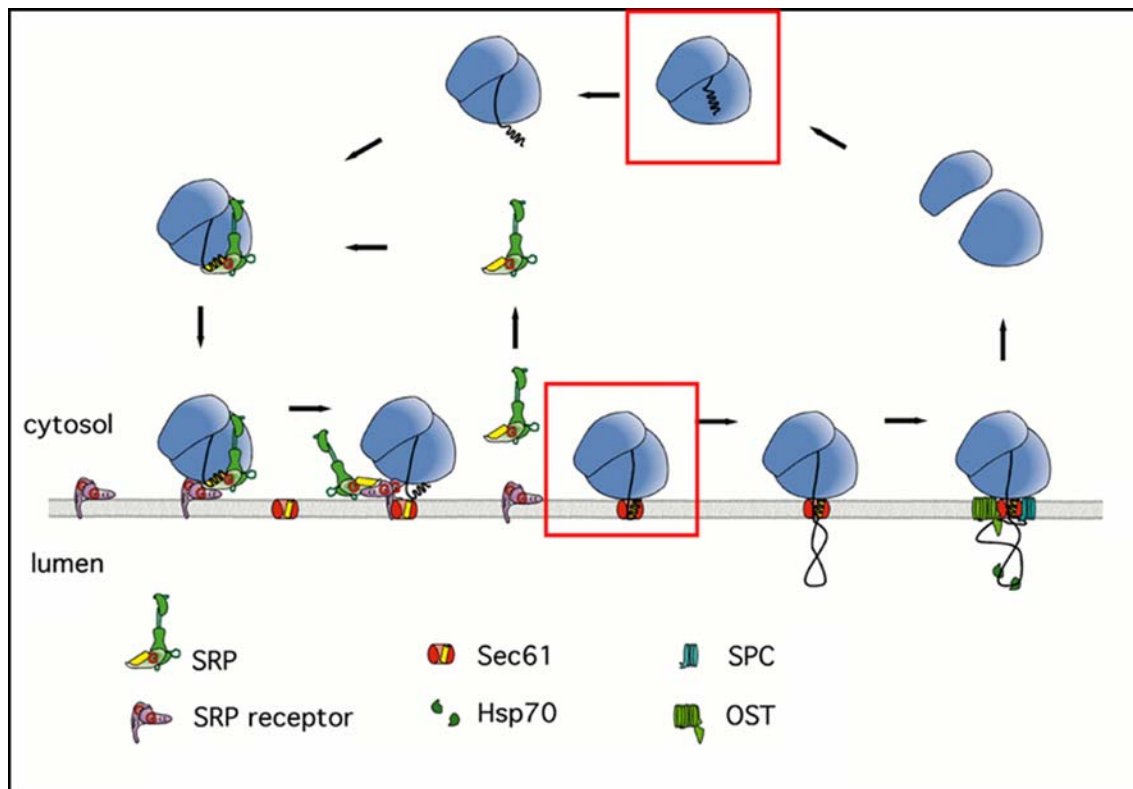


Abb. 2: Übersicht über kotranslationale Proteinsortierung und Translokation. Das Ribosom synthetisiert ein Polypeptid mit naszierender Kette und Signalsequenz für kotranslationale Translokation. Die Signalsequenz wird von SRP erkannt, was zum Elongationsarrest führt. Der Targeting-Komplex kann nun an der ER-Membran mit dem membranständigen SRP-Rezeptor (SR) interagieren. Darauf erfolgt die Übergabe der Signalsequenz an den Sec61-Komplex, der den PCC in der ER-Membran darstellt, und SR und SRP dissoziieren ab. Die naszierende Kette wird nun durch den PCC gefädelt, eventuell durch OST glykosyliert und die Signalsequenz von SPC abgespalten. Aspekte, die in vorliegender Arbeit im Detail behandelt wurden, nämlich die Elongation der Polypeptidkette und der Translokations-Prozess durch die ER-Membran sind mit einem roten Kasten belegt. (Grafik erstellt von R. Beckmann).

In dieser Arbeit wurden zwei Teilaspekte auf dem Weg von der Proteinbiosynthese bis zum fertigen Protein an seinem zellulären Bestimmungsort detailliert betrachtet, nämlich die Elongation der Polypeptidkette und die kotranslationale Translokation. Zum Thema Proteinbiosynthese wird die Struktur des pilzspezifischen Elongationsfaktors eEF3 aus *Saccharomyces cerevisiae* im Komplex mit einem translatierenden 80S Ribosom vorgestellt, die weit reichende Einsichten in den Mechanismus der Elongation ermöglicht hat. Zum Thema Translokation konnte die Struktur des proteinleitenden Kanals aus *Saccaromyces cerevisiae* im Komplex mit einem translatierenden 80S-Ribosom mit naszierender Kette und Signalsequenz gelöst und neue Erkenntnisse über den PCC im aktiven Zustand gewonnen werden.

1.3 Die Elongation der Translation

Die Proteinbiosynthese lässt sich in drei verschiedene Phasen einteilen: Initiation, Elongation und Termination. Bei der Initiation werden mRNA und Initiator-tRNA am Ribosom zu einem translationskompetenten Komplex assembliert. Bei der Elongation wird die mRNA dekodiert und in eine Polypeptidkette übersetzt. Dabei bewegen sich mRNA, Polypeptidkette und tRNAs durch das Ribosom. Bei der Termination kommt es zur Dissoziation des fertigen Proteins sowie der mRNA und tRNA vom Ribosom. In allen drei Phasen der Proteinbiosynthese spielen Translationsfaktoren eine wichtige Rolle.

Zum Anfang des Elongationszyklus befindet sich die Initiator-tRNA in der P-Stelle des Ribosoms. Der Elongationszyklus (Abb. 3) beginnt mit der Bindung des ternären eEF1A-(EF-Tu-)Aa-tRNA-GTP-Komplexes an die A-Stelle des Ribosoms. Dort wird der genetische Code durch Codon-Anticodon-Wechselwirkung zwischen mRNA und tRNA entschlüsselt. Dieser Vorgang stimuliert die GTP-Hydrolyse, und der eEF1A-GDP-Komplex dissoziiert vom Ribosom ab. Danach kommt es zum Peptidyltransfer, wobei das naszierende Polypeptid von der P-Stellen-tRNA auf die an die A-Stelle gebundene Aa-tRNA übertragen wird. Nachfolgend erfolgt die Translokation, die durch den Elongationsfaktor eEF2 (EF-G) katalysiert wird. Dabei rücken die in A- und P-Stelle gebundenen tRNAs in die P- bzw. E-Stelle des Ribosoms. Gleichzeitig bewegt sich die mRNA um ein Basentriplett weiter, so dass das nächste Codon zur A-Stelle hin exponiert wird. Damit das Leseraster nicht verschoben wird, dürfen bei dieser Bewegung die Codon-Anticodon-Wechselwirkungen nicht gebrochen werden. Bei der Translokation erfährt auch das Ribosom einen Konformationsübergang von einem prätranslokationalen (PRE) zu einem posttranslokationalen Zustand (POST). Als letzter Schritt muss das Ribosom wieder in den PRE-Zustand gebracht werden. Dies geschieht

vermutlich konzertiert mit der Bindung des nächsten eEF1A-aa-tRNA-GTP-Komplexes an die A-Stelle. Gleichzeitig dissoziiert die deacylierte tRNA von der E-Stelle ab.

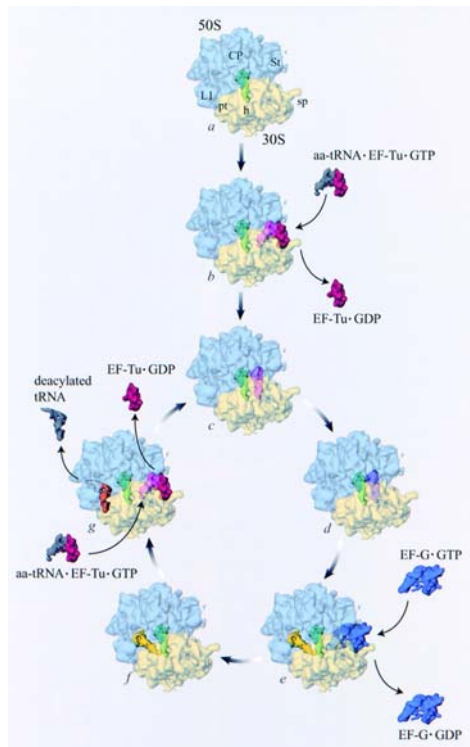


Abb. 3: Schematischer Überblick über den Elongationszyklus in Bakterien. Die Positionen von Elongationsfaktoren und tRNAs wurden über eine Kryo-EM-Struktur des Ribosoms bei 11,5 Å Auflösung gelegt. Die Ansicht ist eine Aufsicht auf transparent dargestellte Elektronendichten des 70S-Ribosoms. Die große 50S-UE ist blau, die kleine 30S-UE gelb, EF-Tu (eEF1A) pink, EFG (eEF2) dunkelblau dargestellt. Nicht an Ribosomen gebundene tRNA ist grau, A-Stellen-tRNA magenta, P-Stellen-tRNA grün, E-Stellen-tRNA gelb gezeigt. Die tRNA in der vermuteten E2-Stelle ist rot dargestellt. CP, zentrale Protuberanz (central protuberance); St, L7/L12-Stalk; L1, L1-Protuberanz; h, Kopf (head); sp, spur; pt, platform; Details sind im Text beschrieben (Agrawal, Spahn et al. 2000).

Bei der Elongation werden in allen Organismen außer *Fungi* die Elongationsfaktoren eEF1A (in Prokaryoten EF-Tu) und eEF2 (EF-G) benötigt. Bei *Fungi* ist ein dritter Elongationsfaktor, eEF3, essentiell (Skogerson 1979).

1.4 Ribosomale Komplexe mit Elongationsfaktoren

Der Elongationszyklus ist ein gutes Beispiel, wie durch die Kombination von Kryo-EM und Röntgenkristallographie molekulare Modelle für komplexe Vorgänge an molekularen Maschinen im funktionalen Kontext erstellt werden konnten. Unter Verwendung von Antibiotika war es möglich, ribosomale Komplexe mit Elongationsfaktoren zu stabilisieren,

mittels Kryo-EM zu visualisieren und Kristallstrukturen von ribosomalen Untereinheiten sowie von Elongationsfaktoren zu docken.

Sowohl eEF1A (EF-Tu) als auch eEF2 (EF-G) binden zwischen der kleinen und großen UE an der so genannten Elongationsfaktor-Bindungsstelle (s. Abb. 3, Abb. 4b, Abb. 5b und Abb. 6) (Wilson, Blaha et al. 2002). Diese Stelle umfasst auf Seiten der großen 50S-UE den α -Sarcin-Ricin-Loop (SRL), eine Region der 23S-rRNA in der Nähe der so genannten *Stalk base*, und auf Seiten der kleinen 30S-UE die Region um Helix 5 und das ribosomale Protein S12 (Abb. 4d).

Verschiedene Strukturen des ribosomengebundenen ternären Aa-tRNA-EF-G-GTP-Komplexes zeigen die Aa-tRNA in einer als A/T-Stelle benannten Position (Stark, Rodnina et al. 1997; Stark, Rodnina et al. 2002; Valle, Sengupta et al. 2002; Valle, Zavialov et al. 2003). Der flexible Anticodonarm befindet sich im Decodierungszentrum der kleinen 30S-UE und nimmt dabei eine Konformation ein, die die initiale Codon-Anticodon-Wechselwirkung erleichtert. Zudem hat die so genannte Ellenbogen- (*elbow*-)Region der tRNA Kontakt zum GTPase-assoziierten Zentrum (GAC), ein 58 Nukleotide langes Segment der 23S rRNA in der Nähe des Proteins L11. Vermutlich wird nach erfolgreicher Ausbildung der Codon-Anticodon-Wechselwirkung und Konformationsänderungen im GAC und in der tRNA die GTP-Hydrolyse in EF-Tu (eEF1A) stimuliert.

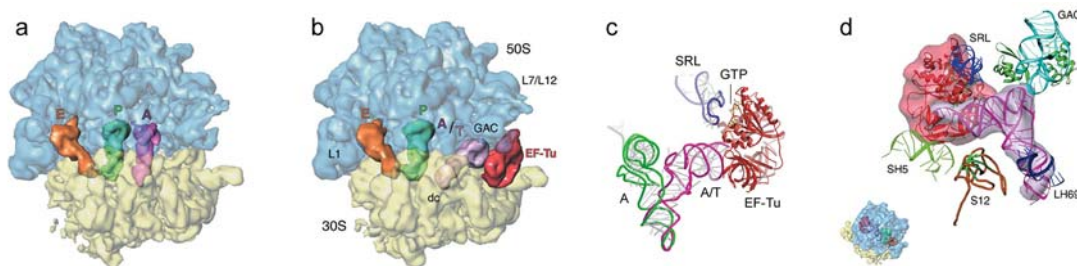


Abb. 4: Kryo-EM- und Kristallstruktur von EF-Tu. Der ternäre Aa-tRNA-EF-Tu-GMP-PNP-Komplex konnte mit dem Antibiotikum Kirromycin (Kir) stabil an ein 70S-Ribosom aus *E. coli* gebunden und Kristallstrukturen des ternären Komplexes in die EM-Dichte gedockt werden. a, Kontrolle ohne Kir, b, 70S-aa-tRNA-EF-Tu-GMP-PNP-Kir-Komplex. Ribosomen und tRNAs sind analog Abb. 3 in Aufsicht gezeigt. In beiden Strukturen kann man auch E-Stellen-tRNA (orange), die aus der Präparation stammt, sehen. c, molekulares Modell für den ribosomengebundenen Aa-tRNA-EF-Tu-GTP-Komplex und A-Stellen-tRNA (Ansicht ist analog b); d, Docking von Atomkoordinaten von Phe-tRNA^{Phe}-EF-Tu-GMP-PNP-Kir in die korrespondierende Elektronendichte; Zur Orientierung hinsichtlich des Ribosoms siehe Struktur links unten. L1, L1-Protuberanz; dc, Dekodierungszentrum (decoding centre); L7/L12, L7/L12-Stalk; GAC, GTPase-assoziiertes Zentrum (GTPase associated centre); SRL, α -Sarcin-Ricin-Loop, SH5, Helix 5 der 30S-UE; S12, Protein S12 der 30S-UE; LH69, Helix 69 der 50S-UE (Valle, Zavialov et al. 2003).

Eine ähnliche Struktur zeigen EF-G (Abb. 5) und eEF2 (Abb. 6), wenn sie ans Ribosom binden (Frank and Agrawal 2000; Gomez-Lorenzo, Spahn et al. 2000; Valle, Zavialov et al. 2003; Spahn, Gomez-Lorenzo et al. 2004). EF-G lagert sich im Vergleich zur nukleotidfreien apo-Form im Kristall um (Abb. 5d) und ähnelt sehr der tRNA im ternären Aa-tRNA-EF-Tu-GTP-Komplex. Auf ribosomaler Seite wird bei Bindung von EF-G ein ratschenähnliches Rearrangement der UEs (Abb. 5c) beobachtet (RSR = *ratchet-like subunit rearrangement*) (Frank and Agrawal 2000). Dabei rotiert die kleine 30S- im Vergleich zur großen 60S-UE um ca. 6°. Die Rotation verläuft - betrachtet von der nach außen exponierten Seite der kleinen 30S-UE gegen den Uhrzeigersinn. Das RSR wird begleitet von Konformationsänderungen innerhalb der UEs, beispielsweise im Bereich des L7-L12-*Stalks*, der *Stalk base* und im GAC der großen UE, sowie einem Rearrangement des Kopfes der kleinen 30S-UE, was unter anderem zur Aufweitung des mRNA-Kanals führt. Es wird spekuliert, dass mit dem RSR die Translokation von mRNA und tRNAs einhergeht. Die Bewegung der kleinen 30S-UE geht in die Richtung der tRNA-Bewegung und führt zur Destabilisierung der tRNAs in A- und P-Stelle, ohne die Codon-Anticodon-Wechselwirkung zu beeinträchtigen. Dies wird unter anderem durch die Flexibilität der tRNA an ihrem CCA-Ende gewährleistet. Nach GTP-Hydrolyse kommt es zur Translokation von mRNA und tRNA und zur Umkehrung des RSR. Diese Umkehrung kann durch Fusidinsäure (Fus) arretiert werden. Nach Dissoziation von EF-G-GDP befindet sich das Ribosom im POST-Zustand. Strukturelle Unterschiede zwischen PRE- und POST-Zustand sind bislang für das 70S-Ribosom nicht bekannt. Bei leeren 80S-Ribosomen aus Hefe wurde allerdings eine Konformation beobachtet, die der Konformation nach dem RSR sehr ähnelt (Gomez-Lorenzo, Spahn et al. 2000). Dieser Zustand, der in 70S-Ribosomen einen hochenergetischen Übergangszustand darstellt, ist in Ribosomen aus *Fungi* stabiler, und stellt möglicherweise den PRE-Zustand dar.

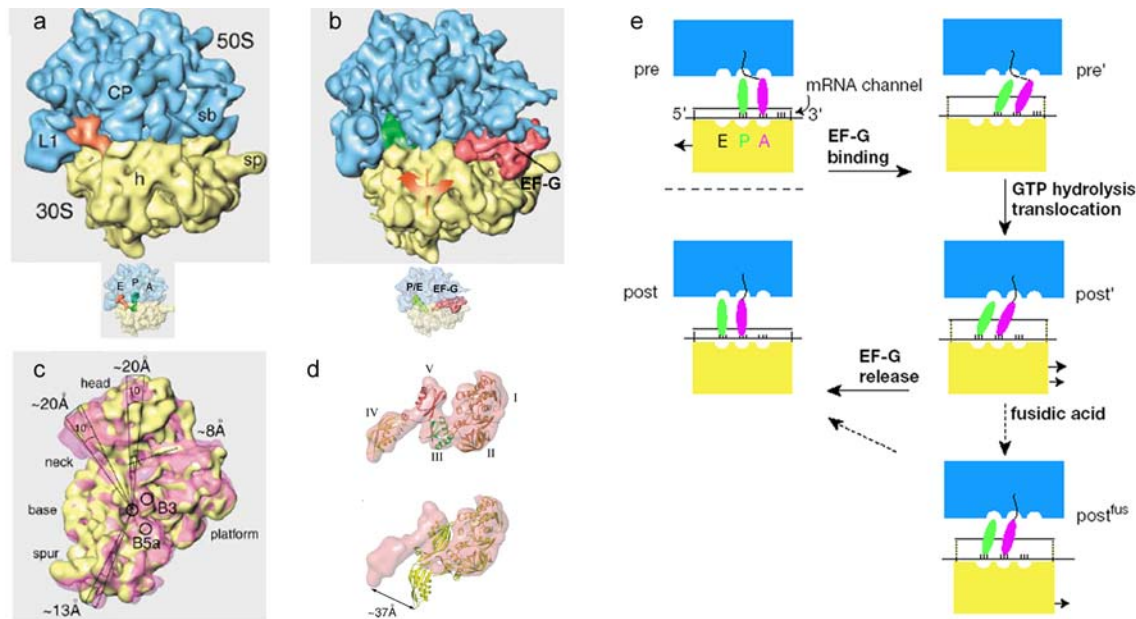


Abb. 5: Kryo-EM- und Kristallstruktur von EF-G. Nach Zugabe von Fusidinsäure (Fus) konnte auch der EF-G-GMPPNP-Komplex stabil an programmierte 70S-Ribosomen gebunden und mit Hilfe von Kristallstrukturen interpretiert werden. a, Kontrolle ohne EF-G, b, 70S-EF-G-GMP-PNP-Komplex, jeweils in Aufsicht analog Abb. 3. Jeweils unten in der Mitte sind ribosomale Elektronendichten transparent dargestellt, um die Positionen von tRNAs besser zu visualisieren. Man beachte die P/E-Hybridposition der tRNA (hellgrün). Die ratschenartige Rotation der 30S-UE ist durch einen orangeroten Pfeil am Kontaktpunkt der UEs zwischen zentraler Protuberanz (CP) der großen und dem Kopf (h) der kleinen UE angedeutet. c, Rotation der kleinen 30S-UE von der Kontaktfläche mit der großen 50S-UE aus gesehen. Die Position vor der Interaktion mit EF-G (ribosomaler PRE-Zustand) ist in halbtransparentem pink, die Position nach der Interaktion mit EF-G in gelb gezeigt. d, Strukturen von EF-G-GDP (halbtransparentes rot) vor (unten) und nach Docken in die korrespondierende EM-Dichte (oben). Die Umlagerung der Domänen III bis V relativ zu den Domänen I und II ist angedeutet (Valle, Zavialov et al. 2003). e, Modell der Translokation. Nach EF-G-Bindung und RSR geht das Ribosom vom PRE-Zustand (A- und P-Stellen-Besetzung) in den PRE'-Zustand über. Nach GTP-Hydrolyse kommt es zur Translokation von mRNA und tRNAs und das Ribosom befindet sich im transienten POST'-Zustand. Möglicherweise gibt es hier Intermediate mit A/P- und P/E-Hybridzuständen, wie in b beobachtet. Nach EF-G-Dissoziation kommt es zur Umkehrung des RSR und das Ribosom befindet sich nun im POST-Zustand (P- und E-Stellen-Besetzung). Das Antibiotikum Fusidinsäure blockiert die Dissoziation von EF-G-GDP. Das Ribosom ist in einem Zustand (POST^{fus}), der dem POST'-Zustand ähnelt und wo RSR zu beobachten ist (Frank and Agrawal 2000).

Bei der Struktur des 80S-Ribosoms im Komplex mit eEF2 (Abb. 6) wurden sehr ähnliche Beobachtungen wie bei den 70S-EF-G-Komplexen gemacht. Hier konnte die Translokation durch das Antibiotikum Sordarin (Sor) blockiert werden. eEF2 bindet in Anwesenheit von Sordarin analog zu EF-G in die Elongationsfaktor-Bindungsstelle, was zum RSR führt. Zusätzlich wurde eine Rotation des Kopfes um 15° in Relation zum *Body* der kleinen 40S-UE

in Richtung der tRNA-Translokation beobachtet. Diese Rotation würde im Zuge der Translokation einen aktiven Beitrag leisten, da die sich bewegenden Domänen direkt mit den tRNAs wechselwirken (Spahn, Gomez-Lorenzo et al. 2004).

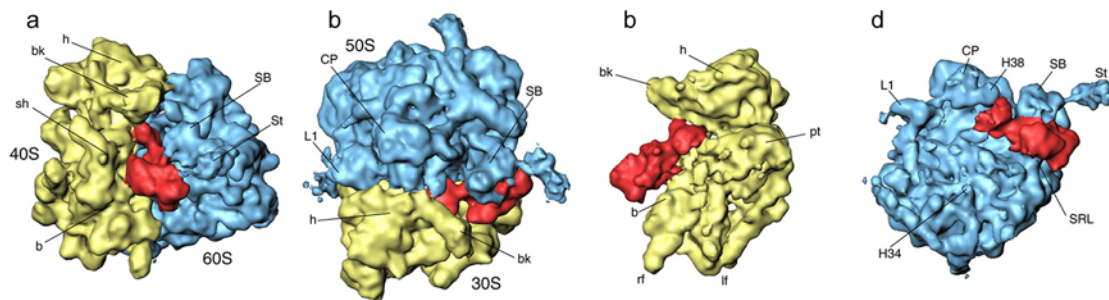


Abb. 6: Kryo-EM-Struktur des 80S-eEF2-Ser-Komplexes aus *S. cerevisiae* bei 11,7 Å. a, Seitenansicht; b, Aufsicht; c, von der 60S-Seite, wobei die große 60S-UE entfernt wurde; d von der 40S-Seite, wobei die kleine 40S-UE entfernt wurde. b, body; bk, beak; h, head; lf, left foot; rf, right foot; pt, platform; sh, shoulder; sp, spur; CP, central protuberance; L1, L1-Protuberanz; SB, stalk base; St = L7/L12-Stalk; H34, Helix 34; H38, Helix 38; SR, α -Sarcin-Ricin-Loop (Spahn, Gomez-Lorenzo et al. 2004).

1.5 Der pilzspezifische Elongationsfaktor eEF3

Die Familie der Pilze (*Fungi*) verfügt über einen dritten Elongationsfaktor, eEF3, der dort ein spezifischer Bestandteil des Translationsapparates ist und beim Elongationsprozess zwingend anwesend sein muss (Skogerson 1979; Dasmahapatra and Chakraborty 1981). Dies macht eEF3 zu einem pharmakologisch interessanten Ziel, denn das Verständnis der Wirkungsweise dieses spezifischen Faktors wäre möglicherweise der Schlüssel zum Design eines wirkungsvollen Fungizids.

1.5.1 Funktion von eEF3

Der Elongationsfaktor eEF3 ist ein Protein von 116 kd mit 1044 Aminosäuren. Es ist, im Gegensatz zu den GTPasen eEF1A und eEF2, eine ATPase, deren Aktivität durch Bindung an Ribosomen 100-fach stimuliert wird (Uritani and Miyazaki 1988). In verschiedenen Experimenten wurde gezeigt, dass eEF3 und ATP die eEF1A-abhängige Bindung von Aa-tRNA an die ribosomale A-Stelle stimulieren (Uritani and Miyazaki 1988; Kamath and Chakraborty 1989; Triana-Alonso, Chakraborty et al. 1995).

Eine sehr genaue biochemische Charakterisierung erfolgte durch Triana-Alonso et al. Experimente mit radioaktiv markierten tRNAs zeigten, dass deacylierte tRNA nur dann durch

den ternären Aa-tRNA-eEF1A-GTP-Komplex aus der E-Stelle dissoziierbar ist, wenn eEF3 und ATP, nicht aber AMP-PNP zugegeben werden. Dies führte zur Vermutung, dass eEF3 möglicherweise die Eigenschaften der E-Stelle moduliert. Gemäß dem allosterischen 3-Stellen-Modell (*allosteric three site model*) sind ribosomale A- und E-Stelle reziprok miteinander gekoppelt (Hausner, Geigenmüller et al. 1988), was erklären würde, weshalb durch eEF3 verursachte Veränderungen in der E-Stelle die Affinität für tRNA in der A-Stelle erhöhen können.

1.5.2 Topologie von eEF3

Gemäß Sequenzanalysen besitzt eEF3 zwei großen Subdomänen. Die N-terminale Domäne ist homolog zu den so genannten HEAT-Domänen, die zweite Domäne enthält zwei ATP-Bindungsmotive, die als ABC-Kassetten oder Walker-Boxen bezeichnet werden. Die zweite, C-terminale ABC-Kassette hat eine für eEF3 spezifische Insertsequenz, die sich als Chromo-Domäne herausgestellt hat. Am C-Terminus befindet sich eine stark geladene Sequenz, die eine große Anzahl an Lysinresten enthält.

HEAT-Domänen bestehen aus Modulen von 37-47 Aminosäuren und bilden stabartige, antiparallele Helix-Loop-Helix-Strukturen aus (Andrade, Petosa et al. 2001). Namensgebende Proteine sind Huntingtin, Elongationsfaktor 3 (eEF3), die 65 kD große regulatorische α -UE der Proteinphosphatase 2A (PP2A) und die PI3-kinase TOR1 aus Hefe. HEAT-Domänen zeigten bislang sehr unterschiedliche Strukturen und erwiesen sich als sehr flexibel. 3-36 dieser helikalen Module (auch *Repeats* genannt) lagern sich oft zu einer gebogenen Struktur zusammen. HEAT-Domänen sind oft bei Protein-Protein-Wechselwirkungen, aber auch bei Protein-RNA-Wechselwirkungen beteiligt.

ABC-Kassetten sind ATP-Bindungsmotive, die für die große Familie von ABC-Proteinen charakteristisch sind. Die weitaus größte Subfamilie stellen die ABC-Transporter dar. Sie sind membranständige Proteine, die den aktiven Transport einer Vielzahl verschiedener Moleküle wie Aminosäuren, Ionen, Toxine, Lipide oder Drogen durch Zellmembranen vermitteln. eEF3 gehört zur kleinen Familie der löslichen ABC-Proteine. Dazu gehören u.a. Rad50 und MutS, Proteine, die bei der DNA-Reparatur involviert sind, oder Elf1p, das beim mRNA-Export aus dem Zellkern beteiligt ist. Aus Kristallstrukturen ist bekannt, dass die duplizierten ABC-Kassetten als Dimere angeordnet sind (Abb. 7a) (Hopfner and Tainer 2003; Locher 2004; Locher and Borths 2004). Abhängig vom gebundenen Nukleotid konnten offene (mit ADP- oder in apo-Form) und geschlossene (mit ATP oder AMP-PNP) Konformationen beobachtet

werden deren Übergang an Konformationsänderungen und Aktivität der jeweiligen Zusatzuntereinheiten gekoppelt ist. Weitere Strukturmerkmale von ABC-Kassetten sind in Abb. 7b erläutert.

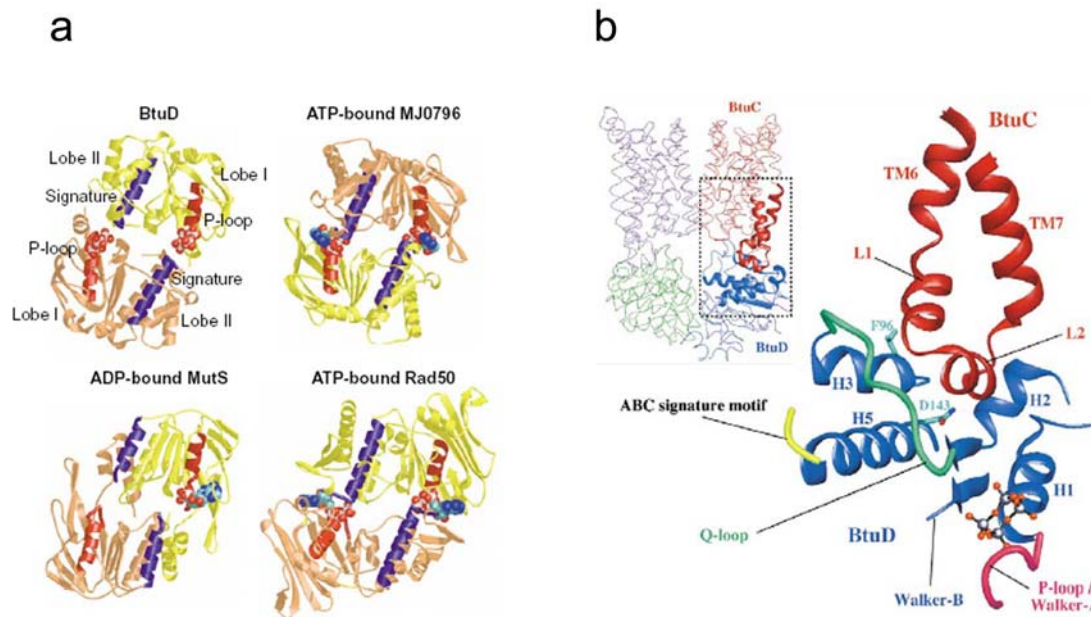


Abb. 7: a, Dimer-Struktur von ABC-Proteinen. Vergleich zwischen Kristallstrukturen der ABC-Kassetten-Dimere von BtuD und MJ0796-ATP, welche zur Familie der ABC-Transporter gehören (oben) und den DNA-Reparatur-Proteinen MutS-ADP und Rad50-ATP (unten). Die ABC-Kassetten haben ein konserviertes Faltungsmuster und zeigen eine konservierte Dimer-Architektur. Die aktiven Zentren befinden sich an den Kontaktstellen zwischen den ABC-Domänen, die eine zweiblättrige Struktur (Lobe1 und Lobe2) aufweisen. Die ATP-gebundenen Formen (MJ0796 und Rad50) weisen im Vergleich mit der nukleotidfreien (BtuD) oder ADP-gebundenen Form (MutS) eine kompaktere, geschlossene Dimer-Anordnung und strukturelle Rearrangements in beiden Lobes auf. Die monomeren ABC-Domänen sind gelb bzw. orange, konservierte Helices rot und blau gezeigt, strukturelle Merkmale der ABC-Kassetten (Lobe1 und Lobe2, P-Loop und Signature-Motiv) sind gekennzeichnet (Hopfner and Tainer 2003). b, Ausschnitt aus der Kristallstruktur des Vitamin B12-Transporters BtuCD (links oben komplett dargestellt), der das aktive Zentrum der ABC-Domäne (blau) und die Kontaktstelle zur TMD (rot) zeigt. Essentielle Sequenzmotive in ABC-Kassetten sind Walker A (P-Loop, pink), Walker B (blau), Q-Loop (türkis) und Signature-Motiv (gelb). Reste, die die Kommunikation zwischen NBD und der TMD vermitteln (D143 und F96) sind als Stabmodell gezeigt (Locher and Borths 2004).

Chromo-Domänen (Chromo, *chromatin organization modifier*) sind Proteindomänen, die Chromatin binden und wurden erstmals als gemeinsames Faltungsmotiv von Regulatoren der Chromatinstruktur (z.B. Heterochromatin-Protein 1, HP1) in *Drosophila melanogaster* entdeckt. Inzwischen wurden viele Subfamilien von Chromo-Domänen charakterisiert die bei der Bindung von methylierten Histonen (z.B. HP1), von DNA (z.B. Transkriptionsrepressor Mi-2) und auch RNA (z.B. HP1, MOF) beteiligt sind (Nielsen, Nietlispach et al. 2005).

1.5.3 Kristallstruktur von eEF3

Erst kürzlich konnten Kristallstrukturen von eEF3 in apo-Form (Abb. 8a) sowie im ADP- und AMP-PNP-gebundenen Zustand gelöst werden (Andersen et al. 2005). Alle drei Strukturen zeigen ein Protein mit fünf verschiedenen Domänen. Der N-Terminus ist in klassischen HEAT-*Repeats* organisiert, die insgesamt 16 Helices umfassen. Auf die HEAT-Domäne folgt ein 4-Helix-Bündel (4HB), das gegen die konkave Seite der HEAT-Domäne gepackt ist. Alle folgenden Reste sind in den ABC-Domänen, ABC1 und ABC2 mit der Chromo-Domäne organisiert. Der positiv geladene C-terminale Bereich fehlt in der Kristallstruktur. Die ABC-Domänen zeigen im Vergleich mit den bisher bekannten Strukturen von ABC-Transporten eine andere relative Orientierung. Hier ist die ABC1-Domäne um 120° gegen ABC2 gedreht. Die eEF3-ADP-Struktur zeigt eine neue, sehr ungewöhnliche Nukleotid-Bindungsstelle an der Grenzfläche zwischen ABC2, HEAT-Domäne und 4HB. Dies könnte allerdings eine Folge der Kristallisationsbedingungen bei pH 5,2 sein und eine inaktive Form von eEF3 darstellen. Um strukturelle Daten für eEF3 bei pH 7,2 in Lösung zu erlangen, wurde die Technik der Röntgenkleinwinkelstreuung (SAXS, *small angle x-ray scattering*) angewandt, mit deren Hilfe niedrig aufgelöste Elektronendichten berechnet werden können. Hier zeigt eEF3 in apo-, ADP-, und ATP-Form eine elongierte Struktur, weshalb angenommen werden kann, dass eEF3 in Lösung das gewöhnliche ABC-Dimer ausbildet. Daraufhin wurden auf Basis der Kristallstruktur Modelle für eEF3 in Lösung für die ADP- und ATP-Form (Abb. 8b) mit den klassischen offenen bzw. geschlossenen ABC-Dimer-Konformationen generiert.

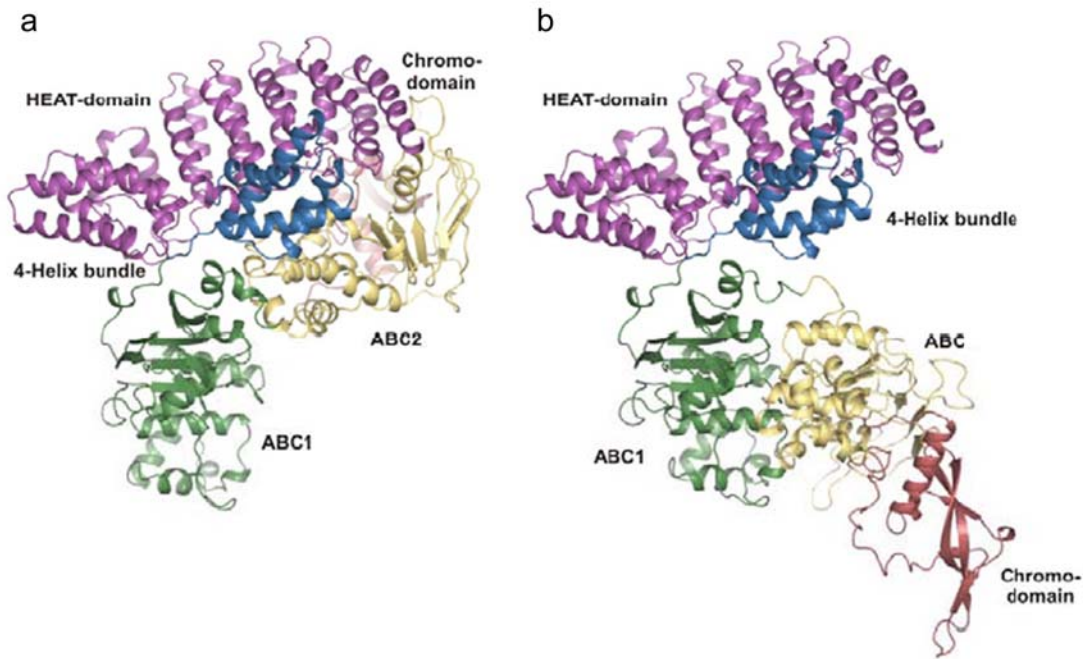


Abb. 8: Strukturen von eEF3 aus Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae*. Die HEAT-Domäne ist violett, das 4-Helix-Bündel blau, ABC1 grün, ABC2 in gelb und die Chromo-Domäne rot dargestellt. a, Kristallstruktur von eEF3-ADP bei einer Auflösung von 2.4 Å. b, Modell von eEF3 in der aktiven ATP-gebundenen Konformation. Der Faktor hat hier eine elongierte Struktur, ABC1 und ABC2 sind als kompaktes Dimer arrangiert, die Chromo-Domäne kommt dabei an der Spitze des Moleküls zu liegen. (Andersen et al. 2005)

1.5.4 Bindungsstellen zwischen von eEF3 und Ribosom

Bisher konnte gezeigt werden, dass eEF3 mit beiden ribosomalen UEs interagiert, und dabei direkten Kontakt mit 18S-rRNA und 26S-rRNA hat (Gontarek, Li et al. 1998; Kovalchuke, Kambampati et al. 1998; Kambampati, Pellegrino et al. 2000). Die Ribotoxine α -Sarcin und Ricin, welche die 26S-rRNA in der Elongationsfaktor-Bindungsstelle schneiden, haben keinen Einfluss auf die ribosomenstimulierte ATPase-Aktivität von eEF3 (Kovalchuke, Kambampati et al. 1998). Daraus wurde gefolgert, dass eEF3 an einer zu anderen Elongationsfaktoren unterschiedlichen Position am Ribosom binden müsste. Weitere Experimente ergaben, dass es mindestens zwei verschiedene ribosomale Bindungsstellen in eEF3 geben muss, eine in der N-terminalen HEAT-Domäne, die andere am C-terminalen Ende. Des Weiteren wurde gezeigt, dass eEF2 und eEF3 nicht gleichzeitig an das Ribosom binden können, die Aktivität von eEF3 jedoch durch eEF1A stimuliert wird (Kovalchuke, Kambampati et al. 1998).

1.6 Fragestellung und Ziele im Zusammenhang mit eEF3

eEF3 ist ein Faktor, der während des Elongationszyklus eine Rolle bei der Dissoziation von E-Stellen-tRNA spielt und auf bislang unbekannte Weise daran beteiligt ist, das Ribosom nach der Translokation wieder in den PRE-Zustand mit hoher Affinität für tRNA in der A-Stelle zu bringen. Es ist jedoch, trotz Aufklärung der Kristallstruktur, sehr wenig über die Interaktion von eEF3 mit dem Ribosom bekannt. Zudem können aus dieser Struktur keine Schlussfolgerungen über die Funktion von eEF3 gezogen werden. Deshalb sollte in dieser Arbeit die Kryo-EM-Struktur von eEF3 in Komplex mit einem Hefe-80S-Ribosom gelöst werden. Folgende Fragen sollen dabei geklärt werden:

- 1.) Wo und wie bindet eEF3 an das Ribosom?
- 2.) Kann man aus der Struktur Schlussfolgerungen auf die Funktion von eEF3 ziehen?
- 3.) Welche Rolle spielen die ABC-Domänen bei der Funktion von eEF3?
- 4.) Welche Rolle spielt eEF3 im Gesamtzusammenhang des Elongationszyklus?
- 5.) Gibt es Unterschiede im Elongationszyklus von *Fungi*, die die Notwendigkeit von eEF3 erklären?

Diese Ziele sollen auf folgendem Wege erreicht werden:

- Reinigung von eEF3 aus *S. cerevisiae*
- Herstellung eines funktionellen eEF3-Ribosomen Komplexes
- 3D Rekonstruktion bei hinreichender Auflösung, um eine molekulare Interpretation mit Hilfe der eEF3-Kristallstruktur und dem molekularen Modell des Heferibosoms vorzunehmen.
- Funktionale Interpretation der eEF3-Struktur
- Einordnung der gewonnenen Erkenntnisse im den Gesamtzusammenhang der Proteinbiosynthese in Eukaryoten.

1.7 Das Translokon in der ER-Membran

Als Translokon wird die Gesamtheit aller an der Proteintranslokation beteiligten Komponenten bezeichnet (Johnson and van Waes 1999). Hauptbestandteil des Translokons ist der proteinleitende Kanal (PCC). In Hefe sind SPC und OST mit dem PCC assoziiert, in *Mammalia* wurden zusätzlich TRAM (*translocating chain associated membrane protein*) (Gorlich and Rapoport 1993) und der TRAP-Komplex (*translocon associated protein complex*) (Hartmann, Gorlich et al. 1993) als Bestandteile des Translokons gefunden. TRAM ist ein häufig vorkommendes Protein in der ER-Membran, das die Translokation mancher sekretorischer Proteine stimuliert und während der Translokation in der Nähe der naszierenden Kette lokalisiert wurde (Voigt, Jungnickel et al. 1996). Zudem wurde eine Rolle als Integrationsfaktor oder Chaperon bei Membranproteinen diskutiert (Do, Falcone et al. 1996). Wie TRAM so konnte auch der TRAP-Komplex mit der naszierenden Kette chemisch vernetzt werden und ist an der Translokation beteiligt (Mothes, Prehn et al. 1994). Erst kürzlich wurde TRAP in nativen ER-Membranen gemeinsam mit dem PCC visualisiert (Menetret, Hegde et al. 2005). Seine exakte Rolle bei der Translokation ist jedoch unklar. Weitere Proteine, die transient mit dem Translokon assoziiert sind, sind lumenale Faltungshelfer wie z.B. Calnexin, Calreticulin, Proteindisulfidisomerase oder BiP sowie der SRP-Rezeptor (Johnson and van Waes 1999).

1.8 Der trimere Sec61-Komplex

1.8.1 Topologie

Der Sec61-Komplex ist evolutionär konserviert und besteht aus drei Untereinheiten (Abb. 9): Sec61 α in Eukaryoten (in *Saccharomyces cerevisiae* Sec61p, in Eubakterien und Archaea SecY) und Sec61 β (in *Saccharomyces cerevisiae* Sbh1p, in Eubakterien und Archaea Sec β), sowie der kleinsten Untereinheit Sec61 γ (in *Saccharomyces cerevisiae* Sss1p, in Eubakterien SecG und Archaea SecE). Die 52 kd große α -Untereinheit besitzt 10 Transmembran- (TM-)Helices und formt den PCC. Sec61 γ ist homolog zu SecE und besitzt eine amphipatische Helix parallel zur Membranebene und eine (Sec61 γ) bzw. drei (SecE) TM-Helices. Sec61 β und SecG sind nicht essentiell und zeigen vergleichsweise geringe Sequenzidentität. Beide sind zum größten Teil membranständig, und haben eine (Sec61 β) bzw. zwei (SecG) TM-Helices.

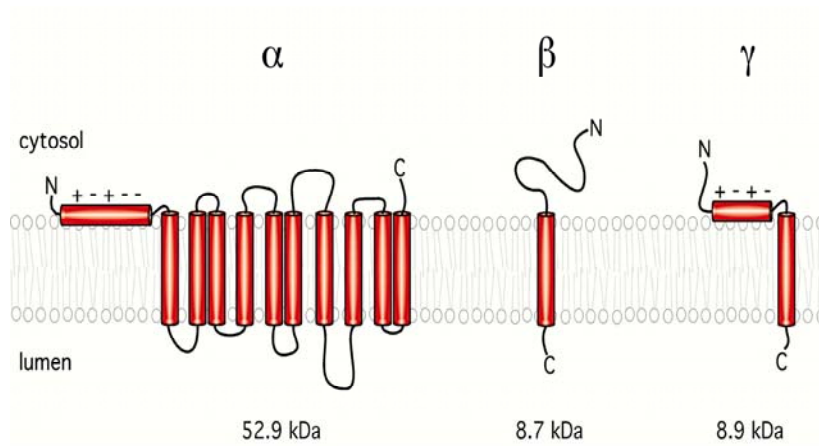


Abb. 9: Übersicht über die Topologie des Sec61-Komplexes in der ER-Membran. (Abb. erstellt von Roland Beckmann)

1.8.2 Eigenschaften

Bei der Translokation werden verschiedene Anforderungen an den PCC gestellt. Zunächst ist er ein Rezeptor für das Ribosom und die Signalsequenz des naszierenden Peptids auf zytosolischer Seite (Gorlich and Rapoport 1993; Kalies, Gorlich et al. 1994; Mothes, Prehn et al. 1994; Jungnickel and Rapoport 1995). Auf der lumenalen Seite kann er mit Hitzeschockproteinen Hsp70 und BiP interagieren. Letzteres spielt eventuell eine Rolle beim Verschluss der Pore des PCC von der lumenalen Seite. (Panzner, Dreier et al. 1995; Hamman, Hendershot et al. 1998).

Nach Bindung der Signalsequenz bewirkt diese ein vertikales Öffnen des PCC zur Translokation des naszierenden Peptids durch die Lipiddoppelschicht (Gilmore and Blobel 1985; Simon and Blobel 1991; Crowley, Reinhart et al. 1993). Im Falle von Membranproteinen ist ein laterales Öffnen zur Integration der TM-Segmente notwendig (Martoglio, Hofmann et al. 1995; Borel and Simon 1996; Heinrich, Mothes et al. 2000). Zudem ermöglicht der PCC die Aufrechterhaltung der Permeabilitätsbarriere für Ionen. Die Frage, wie diese multiplen Funktionen auf struktureller Ebene realisiert werden, macht den trimeren Sec61-Komplex zu einem der interessantesten strukturellen Objekte.

1.8.3 Charakterisierung des PCC

In einer Reihe von Experimenten wurde der PCC während der kotranslationalen Translokation mit Hilfe von Fluoreszenzlöschung charakterisiert. Dabei wurde der aktive PCC als wässriger Kanal mit einem Durchmesser von 40–60 Å beschrieben (Hamman, Chen et al. 1997). Gemäß diesen Experimenten wird der PCC durch die Bindung von RNCs (*ribosome nascent chains*) versiegelt und dadurch die Permeabilitätsbarriere während der Translokation erhalten (Crowley, Liao et al. 1994). Diese Ergebnisse stehen jedoch im Gegensatz zu den Erkenntnissen aus Kryo-EM-Strukturen des ribosomengebundenen PCC, wo eine Lücke zwischen Ribosom und PCC gefunden und nur eine Pore mit weitaus geringerem Durchmesser (variierte zwischen 7–20 Å) beobachtet wurde (Beckmann, Bubeck et al. 1997; Menetret, Neuhof et al. 2000; Beckmann, Spahn et al. 2001; Morgan, Menetret et al. 2002; Menetret, Hegde et al. 2005).

1.8.4 Kryo-EM-Struktur des aktiven RNC-Sec61-Komplexes aus Hefe

2001 konnte durch Beckmann et al. die Struktur des aktiven PCC im Komplex mit einem translatierenden Ribosom mit naszierender Kette (RNC) bei einer Auflösung von 15,4 Å gelöst werden (Beckmann, Spahn et al. 2001). Parallel dazu wurde eine Kontrollstruktur des inaktiven PCC im Komplex mit einem nicht-programmierten Ribosom bei 18 Å bestimmt. Die Rekonstruktion des aktiven Komplexes zeigt ein programmiertes Ribosom mit einer tRNA in der P-Stelle (Abb. 10a, b, c). Der PCC hat eine kompakte Struktur mit einem Durchmesser von 85–95 Å in und 48 Å (Abb. 10d) senkrecht zur Membranebene. Die Struktur des inaktiven Kanals hat gegen die Rückseite der 60S-UE eine etwas elongiertere Form bei einem maximalen Durchmesser von 100 Å (Abb. 10e). In beiden Strukturen wird eine Lücke zwischen Ribosom und Kanal beobachtet. Die Bindung des aktiven Kanals ans Ribosom wird durch vier Kontaktstellen vermittelt und anstatt einer Pore ist nur noch eine Einkerbung mit einem Durchmesser von 7–15 Å zu sehen. In Einklang mit anderen Kryo-EM-Rekonstruktionen wurde aufgrund der Größe der Sec61-Dichte ein Oligomer aus trimeren Sec61-Komplexen vermutet. Die Stöchiometrie des PCC wurde nach Dichtevergleich mit TM-Helices von Rhodopsin auf drei trimere Sec61-Komplexe pro PCC geschätzt (Abb. 10f, 10g). Aus der Analyse der Strukturen wurden zwei Hypothesen aufgestellt, nämlich erstens, dass der PCC hydrophobe Segmente zusammen mit der Polypeptidkette insertieren kann,

ohne eine Pore zu formen, die größer ist als 6 Å, und zweitens, dass der PCC selbst die Ionenpermeabilitätsbarriere darstellt.

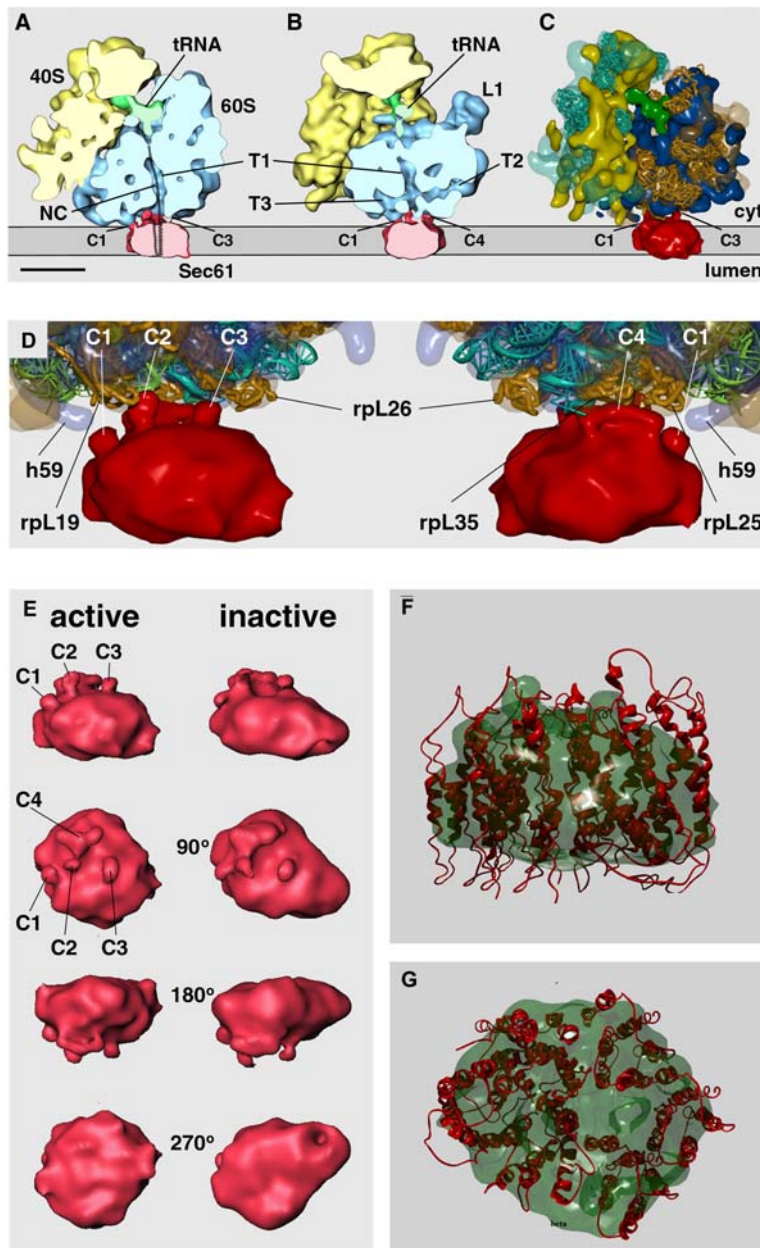


Abb. 10: 3D-Rekonstruktion des aktiven RNC-Sec61-Komplexes aus Hefe. a, b, Schnitte parallel zur Membranebene entlang des ribosomalen Exit-Tunnels. b, entspricht a um 60° um die z-Achse gedreht. Die 40S-Untereinheit ist gelb, die 60S-Untereinheit blau, P-Stellen-tRNA grün und der Sec61-Komplex rot gezeigt. NC, naszierende Kette (nascent chain); T1-T3, Tunnel in der 60S-UE; C1-C4, Kontaktstellen zwischen Ribosom und Sec61-Komplex. c, RNC-PCC-Komplex nach Dichtentrennung von rRNA und Proteinen und Docken von Proteinmodellen in die korrespondierenden Dichten. Dichte von 25S-/5S-rRNA ist blau, Dichte von 60S-Proteinen in transparentem orange, 60S-Proteinmodelle orange, Dichte von 18S-rRNA gelb, Dichte von 40S-Proteinen in transparentem türkis, 40S-Proteinmodelle türkis dargestellt. d, Molekulare Analyse der RNC-Sec61-Verbindungen. Detailansicht von c auf die RNC-Sec61-Kontaktstellen, links in der gleichen Orientierung wie c, rechts um 180° um die z-Achse gedreht. Der Farbcode ist wie in c, zusätzlich sind 25S-rRNA-Modelle von Domäne I türkis und Domäne III grün gezeigt. e, Vergleich der isolierten Dichte des aktiven (links) und

inaktiven (rechts) Sec61-Komplexes. Die obersten Ansichten sind wie in d gezeigt, die Ansichten darunter sind um 90°, 180° und 270° in Richtung des Betrachters gedreht. Die 4 Kontaktpunkte sind mit C1-C4 markiert. Man sieht eine zentrale Einkerbung von der zytoplasmatischen Seite (oben) aus betrachtet. f, Stöchiometrieabschätzung. Die Dichte des Kanals ist in derselben Orientierung wie in d in transparentem grün gezeigt. TM-Helices von 5 Rhodopsinmolekülen sind rot gezeigt. g, Aufsicht von f von der zytoplasmatischen Seite. Die Zahl von 35 Rhodopsinhelices lässt eine Stöchiometrie von 3 trimeren Sec61-Komplexen vermuten (Beckmann, Spahn et al. 2001).

Daraus folgte das einfache binäre Modell für Translokation und Integration von Membranproteinen (Abb. 11). Demzufolge gibt es nur zwei prinzipiell unterschiedliche Funktionszustände des RNC-PCC-Komplexes. Entweder kommt es zur Loop-Insertion, was dazu führt, dass die wachsende Kette ins ER-Lumen transloziert wird, oder zur Non-loop-Insertion, was zur Akkumulation zytoplasmischer Domänen von Membranproteinen führen würde. Welche Art der Insertion stattfindet, hängt von den biophysikalischen Eigenschaften der Signalsequenzen bzw. TM-Segmente, wie z.B. Hydrophobizität, N-/C-terminale Ladungsverteilung etc. ab. Polytopische Membranproteine können nach diesem Modell sehr einfach durch eine Abfolge von Loop- und Non-loop-Insertionen in die Membran integriert werden.

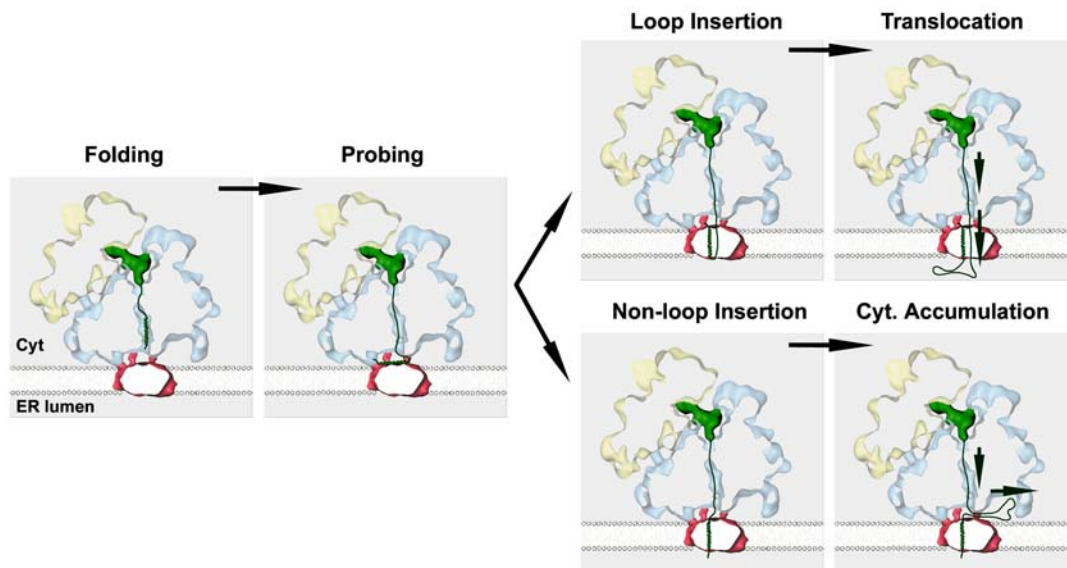


Abb. 11: Binäres Modell der Proteintranslokation und -Integration. Der ribosomale Exit-Tunnel erleichtert die Ausbildung α -helikaler Sekundärstruktur von Signalsequenzen oder TM-Segmenten (folding). Diese werden bei der Insertion auf Hydrophobizität, Helicität, und Natur der flankierenden Sequenzen (vor allem positive Ladungen) untersucht (probing). Diese biophysikalischen Eigenschaften entscheiden über die Orientierung der helikalen Sequenzen (Loop-Insertion und Non-loop-Insertion). In Falle der Loop-Insertion kommt es zur Translokation der naszierenden Kette auf die lumenale Seite, im Falle der Non-loop-Insertion zur Akkumulation einer zytoplasmischen Domäne, die durch die Lücke zwischen Ribosom und Kanal ins Zytosol austreten kann (Beckmann, Spahn et al. 2001).

1.8.5 Kristallstruktur des trimeren SecYE β -Komplexes

Ein großer Durchbruch für das Verständnis des PCC auf molekularer Ebene gelang 2004 durch die Aufklärung der Kristallstruktur des SecYE β -Komplexes aus dem Archaeobakterium *M. jannaschii* (Van den Berg, Clemons et al. 2004). Die Kristallstruktur repräsentiert ein einzelnes SecYE β -Trimer im inaktiven, geschlossenen Zustand. Die SecY (die α -UE) ist zu einer Seite, die als Frontseite (*Front*) bezeichnet wird, offen. Auf den anderen drei Seiten ist sie geschlossen und wird von SecE (γ -UE) und Sec β umgeben. Die TM-Helix von SecE klemmt die α -UE hierbei auf der Rückseite (*Back*) zusammen. Dies gibt dem Komplex von oben betrachtet eine hufeisenförmige Struktur. SecY kann in zwei Hälften mit annähernd gleicher Faltung unterteilt werden, wobei die zweite Hälfte quasi der ersten Hälfte in invertierter Form entspricht. Beide Hälften sind durch eine flexible Scharnier-Region (*Hinge*) an der Rückseite des Moleküls verbunden (Abb. 12a, b).

SecY besitzt eine trichterförmige Pore von etwa 20-25 Å Durchmesser an der zytoplasmatischen Seite, die von polaren und geladenen Resten ausgekleidet ist. Von der lumenalen Seite ist die α -UE durch ein Strukturelement, das *Plug* genannt wird, verschlossen. Dieses Strukturelement, das von dem auf TM1 folgenden, langen Loop und einer verzerrten Helix (TM2a) gebildet wird, könnte sich in einen Hohlraum auf der externen Seite des Moleküls nahe des C-Terminus von SecE bewegen, wodurch ein fast kontinuierlicher wässriger Kanal durch die Membran entstünde. Diese Hypothese wird durch die Tatsache unterstützt, dass TM2a und die TM von SecE chemisch vernetzt werden konnten (Harris and Silhavy 1999). An der engsten Stelle des geöffneten Kanals befindet sich ein Ring von hydrophoben Resten (Abb. 12c, d). Die Öffnung hat an dieser Stelle nur einen Durchmesser von 5-8 Å. Dieser Ring könnte gewährleisten, dass die Permeabilitätsbarriere während der Translokation aufrecht erhalten wird. Neueste *Cross-linking*-Daten zeigen, dass die naszierende Kette tatsächlich mit den Resten des Porenringes interagiert (Cannon, Or et al. 2005). Die Kristallstruktur gibt auch Aufschlüsse darüber, wie Signalsequenzbindung und laterales Öffnen funktionieren könnten. Die Bindungsstelle für die Signalsequenz wird aufgrund von *Cross-linking*-Experimenten zwischen TM2 und TM7, die an der Frontseite der α -UE gelegen sind, vermutet (Plath, Mothes et al. 1998). Gemäß der Kristallstruktur ist laterales Öffnen nur durch auf der *Front*-Seite möglich. Dies könnte durch Bewegungen der *Hinge*-Region geschehen, was zu einer Aufhebung der Interaktionen zwischen TM2b mit TM7 und TM8 auf der zytoplasmatischen Hälfte und zwischen TM3 und TM7 auf der externen Hälfte, und damit ein laterales Öffnen zur Folge hätte. Diese postulierte Bewegung

wurde auch als das „Atmen“ des Moleküls bezeichnet (*breathing*) (Osborne, Rapoport et al. 2005).

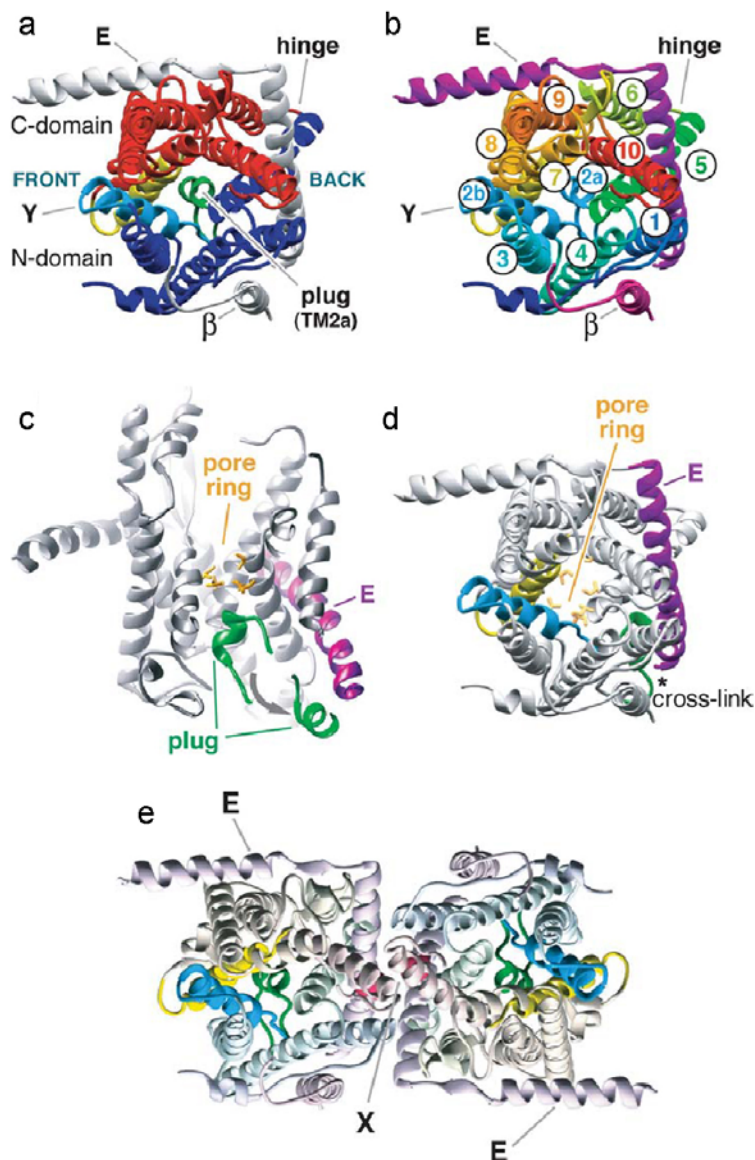


Abb. 12: Kristallstruktur des SecYEβ-Komplexes. a, b Ansicht von oben (Zytosol). Die N-terminale Domäne von SecY ist in a mit Ausnahme von TM2b (hellblau) dunkelblau, die C-terminale Domäne bis auf TM7 (gelb) rot gezeigt. Die Signalsequenz interkaliert an der Front-Seite zwischen TM2b und TM7. Der Plug (grün) blockiert die Pore des inaktiven Kanals. In b sind die einzelnen TM-Helices von SecY durchnummeriert. c, Seitenansicht, wobei die vordere Hälfte der Struktur entfernt wurde. Die vermutete Bewegung des Plugs in Richtung von SecE (magenta) ist angedeutet. Reste, die den hydrophoben Porenring auskleiden, sind in gold gezeigt. d, Modell des geöffneten Zustands, Ansicht wie a, der Plug befindet sich in einem Hohlraum nahe SecE. Ein Stern bezeichnet die Position, in der ein Cross-link zwischen Plug und SecE gefunden wurde. e, Modell für das back-to-back-Arrangement eines SecYEG-Dimers aus *E. coli*, wie es in einer EM-Struktur von 2D-Kristallen (Breyton, Haase et al. 2002) beobachtet wurde. Cysteine, die an den rot markierten Positionen (X) eingeführt wurden, konnten effizient chemisch vernetzt werden (Van den Berg, Clemons et al. 2004; Osborne, Rapoport et al. 2005).

Aus der Struktur wurde ein verfeinertes Modell für den Translokationsmechanismus erstellt, demgemäß ein oligomeres Arrangement von Sec61-Trimeren nicht ausgeschlossen wird, jedoch nur eine Kopie des trimeren Sec61-Komplexes für die Translokation nötig ist.

1.8.6 Modelle für den aktiven Zustand des PCC

Ein Großteil an biochemischen und biophysikalischen Daten lässt vermuten, dass der PCC im aktiven Zustand ein Oligomer aus zwei bis vier trimeren Sec61/SecYEG-Komplexen ist (Hanein, Matlack et al. 1996; Manting, van Der Does et al. 2000; Beckmann, Spahn et al. 2001; Collinson, Breyton et al. 2001; Bessonneau, Besson et al. 2002; Menetret, Hegde et al. 2005; Scheuring, Braun et al. 2005). Für das oligomere Arrangement des PCC im aktiven Zustand wurden nach Veröffentlichung der Kristallstruktur mehrere Modelle diskutiert. Eine 2D-Kristallstruktur des *E.coli*-SecYEG-Komplexes zeigt ein Dimer aus zwei trimeren SecYEG- (oder Sec61 $\alpha\beta\gamma$ -) Komplexen in so genannter *back-to-back*-Anordnung (Abb. 12e) (Breyton, Haase et al. 2002). Die Kryo-EM-Struktur eines RNC-Kanal-Komplexes (RCC, *ribosome-channel-complexes*) aus *Mammalia*, für den native Membranen aus Hundepankreas verwendet wurden, zeigt ein größeres Translokon mit einer zusätzlichen lumenalen Domäne einer Masse von ca. 100-150 kD an der zur 40S-UE zugewandeten Seite (Abb. 13a) (Menetret, Hegde et al. 2005). Diese Domäne konnte als TRAP identifiziert werden. In die EM-Dichte, die den Sec61-Komplex dargestellt, wurden ein Tetramer bestehend aus zwei Dimeren in *back-to-back*-Anordnung gedockt, allerdings bei einer lokalen Auflösung von 25 Å für den PCC (Abb. 13b, c).

Erst kürzlich wurde die Kryo-EM-Struktur eines RNC-SecYEG-Komplexes aus *E.coli* bei einer Auflösung von 15 Å gelöst (Abb. 13d) (Mitra, Schaffitzel et al. 2005). Für die Struktur des PCC wurde hier wiederum ein Dimer vorgeschlagen, bei dem die beiden Monomere an der *Front*-Seite lateral geöffnet wurden und in einer *front-to-front*-Anordnung arrangiert sind (Abb. 13e).

Aufgrund der niedrigen Auflösung, insbesondere für die PCCs (bei ca. 15 Å) erscheinen die bisherigen Modelle für den aktiven Zustand sehr jedoch präliminär.

1.9 Integration von Membranproteinen

1.9.1 Modelle für die Integration polytopischer Membranproteine

Die Integration von Membranproteinen in die Lipiddoppelschicht ist ein bisher noch sehr wenig verstandener Vorgang. Die Membranintegration von Proteinen mit nur einer TM-Helix kann als passiver Partitionierungsprozess beschrieben werden, wobei der Sec61-Kanal dem TM-Segment erlaubt, zwischen der eher hydrophilen Proteinumgebung des Kanals und der hydrophoben Umgebung im Inneren der Lipiddoppelschicht zu äquilibrieren (Heinrich, Mothes et al. 2000). Die Geschwindigkeit der Partitionierung hängt von der Länge und Hydrophobizität der Sequenzen ab. So werden lange, hydrophobe TM-Sequenzen eher in die Membran partitionieren als kürzere, hydrophilere Sequenzen, wie beispielsweise Signalsequenzen von zu translozierenden Proteinen.

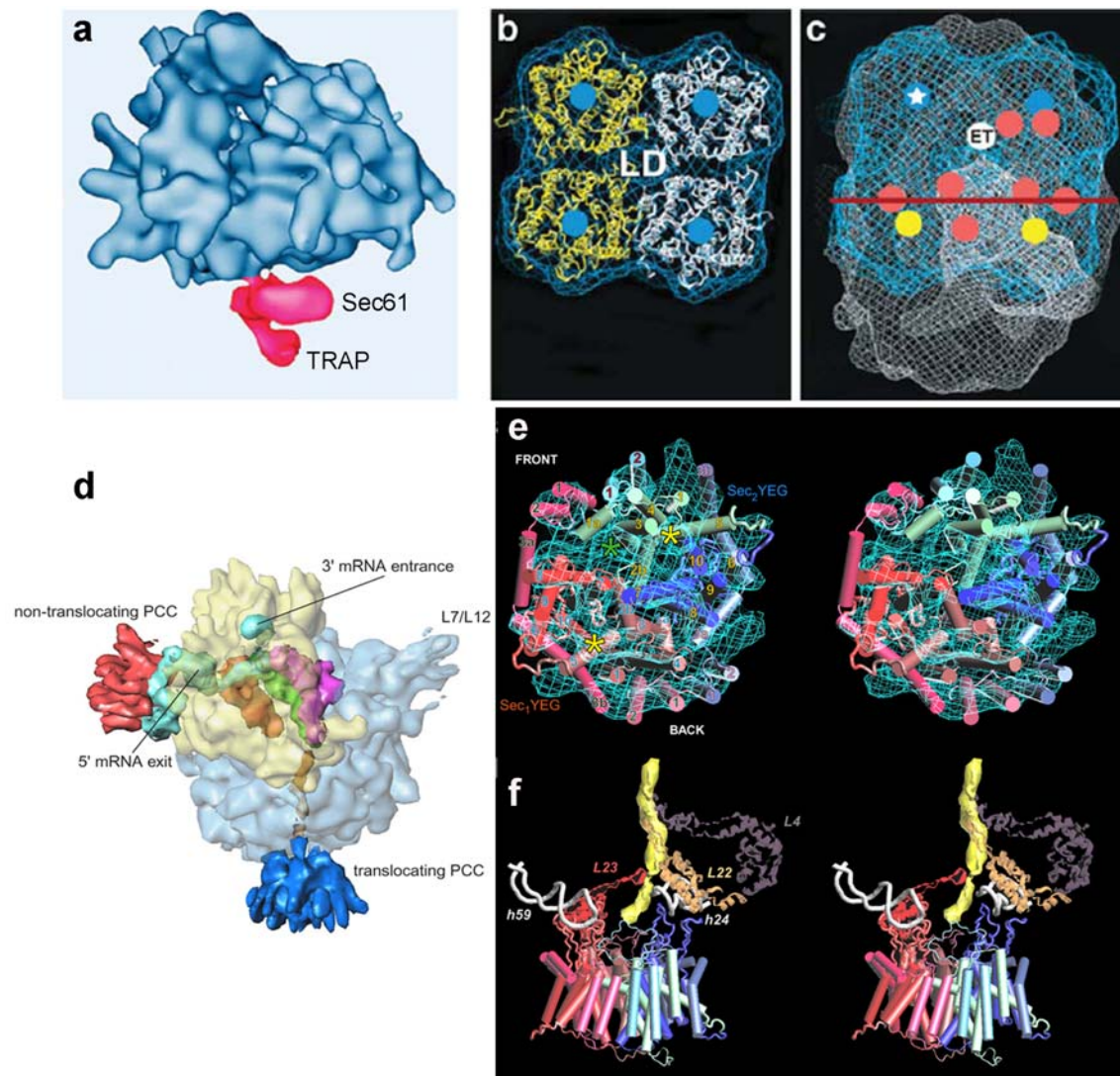


Abb. 13: Molekulare Modelle für den aktiven, oligomeren Zustand des Sec61- (SecYEG)-Komplexes. a, Kryo-EM-Rekonstruktion des RNC-PCC-Komplexes aus Mammalia. Die lumenale Domäne konnte als TRAP identifiziert werden. b, Docking zweier Sec61-Dimere in back-to-back-Anordnung (gold und weiß) in die Elektronendichtekarte aus 2D-Kristallen von SecY. Die möglichen Poren gemäß der Kristallstruktur sind mit blauen Punkten gekennzeichnet. LD, Region mit geringer Dichte (low density). c, Elektronendichte des nativen PCC in Maschendraht-Darstellung (weiß). Der molekulare Umriss eines Sec61-Tetramers wie in b ist in blau dargestellt. ET, ribosomaler Exit-Tunnel; rote Punkte, Verbindungen zwischen Ribosom und Kanal; gelbe Punkte, Poren, die von der ribosomalen Exit-Stelle nur schwer zugänglich und möglicherweise inaktiv sind; blaue Punkte, mögliche aktive Poren. Der mit einem Stern gekennzeichnete Sec61-Komplex zeigt keine Verbindungen zum Ribosom (Menetret, Hegde et al. 2005). d, Kryo-EM-Rekonstruktion des RNC-SecYEG-Komplexes aus *E. coli*. Die 30S-UE ist gelb, die 50S-UE blau, A-, P- und E-Stellen-tRNAs magenta, grün, und orange, mRNA türkis und die naszierende Polypeptidkette in gold dargestellt. Die Rekonstruktion zeigt einen inaktiven PCC (rot) am der Austrittsstelle der 5'-mRNA und einen aktiven PCC am Exit-Tunnel (blau) der großen 50S-UE. e, geöffnetes front-to-front-Dimer als molekulares Modell für den aktiven PCC. Die Elektronendichte ist als Maschendraht in türkis von unten gezeigt, ein Monomer (Sec1YEG) ist in Rottönen, das andere (Sec2YEG) in grün (N-terminale Hälfte) und violett (C-terminale Hälfte) gezeigt. Die Helices sind durchnummeriert. Nicht zugeordnete Elektronendichten sind mit grünen und gelben Sternen markiert. Die

Signalsequenz wird an der Stelle des grünen Sterns in der Nähe der TM-Helices 7 und 8 des ersten (rot) und TM 2b und 3 des zweiten (grün) vermutet. Die anderen Dichten könnten dem Plug zugeordnet werden. f, Molekulare Kontakte der naszierenden Kette und des PCC mit dem Ribosom. Die isolierte Dichte der naszierenden Kette ist gelb gezeigt. Sie kontaktiert die ribosomalen Proteine L4, L22 und L23. Der PCC kontaktiert mit den zytosolischen Loops Helix 59 auf der einen und Helix 24 auf der anderen Seite. Der dritte Kontakt wird zwischen SecE/SecG und L23/L29 ausgeübt (Mitra, Schaffitzel et al. 2005).

Für Proteine mit mehreren TM-Helices gibt es zwei Insertionsmodelle (Abb. 14). Gemäß dem linearen Insertionsmodell integrieren die TM-Segmente in der Reihenfolge ihrer Synthese einzeln in die Membran (Blobel 1980; Sabatini, Kreibich et al. 1982). Bei Bündelungsmodell bleiben alle TM-Segmente bis zur Termination der Translation im PCC und werden erst dann als Ganzes in die Membran integriert (Borel and Simon 1996). Dieses Modell würde die Beobachtung erklären, dass die Topologie von TM-Segmenten durch nachfolgend synthetisierte TM-Segmente verändert werden kann. Möglicherweise kommt es *in vivo*, je nach Art des Proteins, zu einer Kombination der Mechanismen beider Modelle. Dies wurde am Beispiel der Leader-Peptidase gezeigt, die zwei miteinander interagierende TM-Helices enthält (Heinrich, Mothes et al. 2000; Heinrich and Rapoport 2003). Neben Sec61 spielen bei manchen Substraten noch weitere Proteinfaktoren eine Rolle bei der Insertion von Membranproteinen. In Bakterien ist YidC bei der Membranintegration der meisten Proteine beteiligt (Scotti, Urbanus et al. 2000), bei *Mammalia* wurden TM-Segmente mit dem Protein TRAM chemisch vernetzt, das vermutlich ein als Membranprotein-Chaperon fungiert (Do, Falcone et al. 1996).

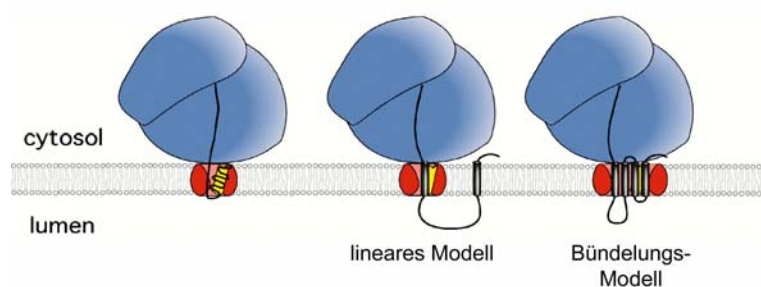


Abb. 14: Lineares Modell und Bündelungsmodell der kotranslationalen Integration von Membranproteinen (Abb. erstellt von Roland Beckmann).

1.9.2 Substrate zu Reinigung von Insertionsintermediaten während der kotranslationalen Membranprotein-Integration

Zum Studium der Integration von Membranproteinen sollen Proben hergestellt werden, die die Lösung einer hoch aufgelösten Kryo-EM-Struktur des Sec61-Komplexes bei der Integration eines Membranproteins ermöglichen. Zu diesem Ziel wären zwei grundsätzlich verschiedene Ansätze denkbar. Zum einen kann man versuchen, den bisherigen *in vitro* Ansatz, nach dem der 80S-RNC-Sec61-Komplex aus Hefe hergestellt wurde (Beckmann, Spahn et al. 2001), auf ein Modellsubstrat für Membranproteine, beispielsweise Opsin, zu übertragen. Demnach werden programmierte Ribosomen mit einer naszierenden Kette nach *in vitro* Translation (IVT) einer trunkierten mRNA isoliert, wobei die naszierende Kette eine Signalsequenz für kotranslationale Translokation besitzt und genau die Mindestlänge für eine Loop-Insertion hat. Die RNC-Sec61-Komplexe werden dann durch Zugabe von gereinigtem Sec61 in Detergenz *in vitro* rekonstituiert. Der Nachteil dieser Methode, insbesondere bei naszierenden Ketten von Membranproteinen ist, dass die Insertion in den Kanal nicht auf dem physiologischen Sortierungsweg stattgefunden hat und damit unspezifisch sein kann. Bei stark hydrophoben Membranproteinen mit großer Tendenz zur Aggregation stellt sich die *in vitro* Rekonstitution deshalb als sehr schwierig realisierbar dar. Um diese Probleme zu umgehen, soll versucht werden, getaggte naszierende Opsinfragmente während einer IVT kotranslational in Pankreasmembranen zu insertieren und dann RNC-Sec61-Komplexe mit insertiertem Opsin aus den Membranen zu reinigen.

Beim *in vivo* Ansatz ist die Idee, getaggte Insertionsintermediate direkt aus Hefe zu reinigen. Das Problem hierbei ist, die Translation des gewünschten Substrates an einer definierten Stelle zu stoppen, ohne dass die naszierende Kette vom Ribosom dissoziiert. Als Werkzeug zur Generierung einer *in vivo* Stoppkassette sollte die mRNA des Hac1p-Proteins genutzt werden. Hac1p ist ein Transkriptionsfaktor, der die Gene für die *unfolded protein response* (UPR) in Hefe aktiviert (Cox and Walter 1996) und ein Beispiel für Attenuation in Hefe. Die mRNA bildet dabei einen stabilen Komplex mit dem Ribosom aus, was zum Stopp der Translation des Hac1p-Proteins führt. Die Attenuation beruht auf Sequenzen des 5'-UTR und dem 3'-Bereich der *HAC*-mRNA, die vermutlich miteinander Basenpaarungen ausbilden (Rueggsegger, Leber et al. 2001). Diese Sequenzen sollen genutzt werden, um die Translation von Membranproteinen an gewünschter Stelle *in vivo* zu stoppen.

1.10 Fragestellung und Ziele im Zusammenhang mit dem trimeren Sec61-Komplex

Obwohl in den letzten Jahren ein großer Fortschritt beim Verständnis des PCC gemacht wurde, bleiben noch viele Fragen, vor allem über den aktiven Zustand des Kanals, offen. Ein bislang ungeklärtes Problem ist der Oligomerisierungsgrad des PCC. In allen bisherigen (Kryo-)EM-Rekonstruktionen wurde Dichten gefunden, die mit hoher Wahrscheinlichkeit Sec61-Oligomere repräsentieren. Für den ribosomengebundenen, aktiven Zustand des bakteriellen SecYEG-Komplex wird ein SecYEG-Dimer in der so genannten offenen *front-to-front*-Anordnung postuliert, in der 2D-Kristallstruktur des *E.coli*-SecYEG-Komplexes wird eine *back-to-back*-Dimer-Anordnung gefunden. In die Elektronendichte des aktiven Sec61-Komplexes aus *Mammalia* wird ein Tetramer in *back-to-back*-Anordnung gedockt. Beim Hefe-RNC-Sec61-Komplex wurde das Trimer als wahrscheinlichste Stöchiometrie geschätzt. Bei all diesen Rekonstruktionen ist jedoch die Auflösung zu niedrig, um die Komponenten des aktiven PCC (beispielsweise das Monomer oder die C- und N-terminalen Hälften) auf eindeutige Weise in die Elektronendichte zu docken. Deshalb sollte eine hochaufgelöste Struktur ($< 7\text{-}8\text{ \AA}$) des Hefe-RNC-Sec61-Komplexes rekonstruiert werden, um folgende Fragen zu lösen:

- 1.) Ist der Sec61-Komplex aus Hefe ein Monomer oder ein Oligomer? Falls letztes zutrifft, wie viele Monomere bilden einen aktiven Kanal und wie sind die Monomere im Oligomer arrangiert? Was ist der Zweck der Oligomerisierung im aktiven Zustand?
- 2.) Wie bindet Sec61 an das Ribosom, welches sind die ribosomalen Bindungspartner?
- 3.) Wie wird die Signalsequenz im aktiven Zustand gebunden?
- 4.) Wie ist der Mechanismus des vertikalen und lateralen Öffnens?

Die hochaufgelöste Struktur des 80S-RNC-Sec61-Komplexes sollte durch folgende Schritte gelöst werden:

- Verbesserung der Präparation von Hefe-RNCs hinsichtlich Ausbeute, Anreicherung und Qualität der Ribosomen.
- Sammlung eines ausreichend großen Datensatzes (> 100000 Partikel) für Hochauflösung am Tecnai Polara F30 Mikroskop und 3D-Rekonstruktion.
- Identifikation der Bausteine des aktiven PCC durch Docken der Kristallstruktur des Sec61-Komplexes in die Elektronendichte und Erstellung eines Modells für den Sec61-Komplex im aktiven Zustand.

Zusätzlich sollten Substrate zur Generierung von Insertionsintermediaten bei der kotranslationalen Integration von Membranproteinen generiert bzw. optimiert werden.

2. Materialien und Methoden

2.1 Anzucht von Hefen (*S. cerevisiae*)

Zur Anzucht von Hefen wurde YPD-Flüssigmedium (Difco) verwendet. Für die Anzucht großer Mengen (10 l) wurde das YPD-Medium aus den Komponenten Hefeextrakt (Difco, 20 g/l), Pepton (Difco, 10 g/l) und Dextrose (20 g/l, Roth) hergestellt, Dextrose wurde hierbei getrennt autoklaviert. Nach Erreichen einer Zelldichte von 2,5 OD₆₀₀/ml wurden bei Bedarf zusätzlich 10 g/l Dextrose zugegeben. Synthetisches Selektionsmedium SC-Ura (Complete Minimal) wurde mit 1,7 g/l YNB-AA/AS (Yeast Nitrogen Base without Amino acids and Ammonium sulphate, Difco), 5 g/l (NH₄)₂SO₄, 20 g/l Glucose und 0,72 g/l Dropout-Pulver ohne Uracil und Tryptophan (Sherman et al., 1979) hergestellt und mit 40 mg/l Tryptophan (Serva) versetzt. Feste Nährböden enthielten 20 g/l Bacto™ Agar (Difco). Für die Expression von Genen hinter dem Galaktose-Promoter wurden *S. cerevisiae* Zellen aus der logarithmischen Wachstumsphase (ca. 0,4 OD₆₀₀) in Induktionsmedium (SC-Ura-Medium mit 10 g/l Raffinose und 20 g/l Galaktose) überführt. Die Induktion der galaktoseabhängigen Gene fand für 10-24 Stunden bei 30°C statt. Gefrierkulturen wurden hergestellt, indem 1 ml Vorkultur mit 400 µl 80% Glycerin sorgfältig vermischt und anschließend bei -70°C gelagert wurde.

2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.1 DNA-Amplifikation durch PCR (*polymerase chain reaction*)

Als Vorlage (*Template*) für die DNA-Amplifikation wurde entweder gereinigte Vektor-DNA oder chromosomale DNA aus *S. cerevisiae* verwendet. PCR-Reaktionen wurden mit dem EasyStart™ Micro 100-PCR-Kit (Molecular BioProducts, Fisher) bei *Template*-Konzentrationen von 0,5-5 nM und Primer-Konzentrationen von 50 pM durchgeführt. Für die Kettenelongation wurden entweder 50 U/ml Taq DNA-Polymerase (Eppendorf) oder *proof-reading*-Polymerase (CombiZyme DNA-Polymerase, Invitek) verwendet. Die PCR-Bedingungen ergaben sich aus einer einminütigen Denaturierung der Primer bei 95°C, gefolgt von 30 Amplifikationszyklen bestehend aus Denaturierung bei 95°C für 45 sec, Primeranlagerung bei 50-62°C für 1 min und DNA-Polymerisation bei 72°C für eine der Größe des zu amplifizierenden DNA-Fragments angepassten Zeitspanne von ca. 1 min pro 1000 Basenpaaren. Jeweils 1-2 µl der amplifizierten Fragmente wurden nach Angaben des

Herstellers mit dem TOPO-TA-Cloning[®] Kit (Invitrogen) in den Vektor pCR2.1[®]-TOPO[®] oder in den Hefe-Expressionsvektor pYES2.1[®]/V5.His-TOPO[®] ligiert und sequenziert.

2.2.2 Oligonukleotide

Alle Oligonukleotide wurden von der Firma BioTez (Berlin) synthetisiert. Sie wurden als Primer für die Amplifikation von DNA mittels PCR (*polymerase chain reaction*) verwendet. Die verwendeten Primer sind in Tabelle 1 aufgelistet.

Oligonukleotid	Sequenz (5' → 3')	Bemerkung
Primer für eEF3		
5'-YEF3-fow	AAA AAA ATG TCT GAT TCC CAG CAA TCC ATT AAG G	-1-6-Sequenz
3'-YEF3-Xa-His-rev	TTA ATG ATG ATG ATG ATG ATG ATG ATG ATG ATG TCT ACC TTC AAT TCT ACC TTC AAT GAA TTC TTC GTC AGA AGA AAC GTA AGC	His-Tag Faktor Xa-Schnittstelle
Primer für DPAP-B-Konstrukte		
T7	TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG	
5'-DP-HA	TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGA CCA AAC AAA ACA AAT AAA ACA AAA ACA CAA TGT TAC CCA TAG ATG TTC CA G ATT ACG CTG AAG GTG GCG AAG AAG AAG TTG	T7 HA-Tag
5'-DP-His-HA	TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGA CCA AAC AAA ACA AAT AAA ACA AAA ACA CAA TGT CTC ATC ATC ATC ATC A TC ATA CCC ATA GAT GTT CCA GAT TAC GCT GAA GGT GGC GAA GAA GAA GTT G	T7 His-Tag HA-Tag
3'-DP600	ATT CGG TCC CCC ATA TGC AAA GAA	
3'-DP90	TTG CAG CTC GTG ATA TTT GGG ATG	
3'-DP120	ATC GTA GAC AGA TTT AAC AAC GTA	
3'-DP90-BAM	CGC GGA TCC TTG CAG CTC GTG ATA TTT GGG ATG	BAMHI- Schnittstelle
3'-DP120-BAM	CGC GGA TCC ATC GTA GAC AGA TTT AAC AAC GTA	BAMHI- Schnittstelle

Primer für <i>HAC</i> -Konstrukte		
5'-opt-HAC	<i>TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGC</i> AAG GCT TTA ACT CAG TGT CAA ACA TAA CAA CCT CCT CCT CCC CCA CCT ACG ACA ACA ACC AAC ACA ATG TCT TAC CCA TAC GAT GTT CCA GAT TAC GCT	<i>T7</i> HA-Tag
5'-HAC-CAS-BAM	TCA ATT GAT CTT GAC AAT TGG CGT AAT CCA <u>CCC</u> GTG ATT ACG ATG ACC AGG <i>GGA</i> <i>TCC</i> GCG	<i>BAMHI-</i> <i>Schnittstelle</i> <u>G885C-Mutation</u>
3'-HAC-CAS	TTC AAA TGA ATT CAA ACC TGA CTG CGC <u>TTG</u> GGA CAG TAC AAG CAA GCC	<i>BAMHI-</i> <i>Schnittstelle</i> <u>G1107C-</u> <u>Mutation</u>
Oligonukleotid	Sequenz (5' → 3')	Bemerkung
Primer für <i>Opsin</i> -Konstrukte		
5'-His-Ha-Ops	<i>TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGA</i> CCA AAC AAA ACA AAT AAA ACA AAA ACA CAA TGC <i>ATC ATC ATC ATC ATC ATT ACC CAT ACG ATG</i> TTC CAG ATT ACG CTT ACC CAT ACG ATG TTC CAG ATT ACG CT	<i>T7</i> <i>His-Tag</i> HA-Tag
3'-fl-OPS	GGC AGG CGC CAC TTG GCT GGT	
3'-fl-OPS-stop	TTA GGC AGG CGC CAC TTG GCT GGT	
3'-OPS141	CTT GCA CAC CAC CAC GTA CCG CTC G	
3'-OPS146	GAA GTT GCT CAT GGG CTT GC	
3'-OPS150	CTC ACC GAA GCG GAA GTT CG	
3'-OPS183	CAT GCC CTC CGG GAT GTA TCT AGA CC	
3'-OPS188	CCC GCA CGA GCA CTG CAT GCC C	
3'-OPS193	CGT GTA GTA ATC GAT CCC GC	
3'-OPS277	GGT GAA GAT GTA GAA CGC CAC	
3'-OPS284	CCC AAA GTC AGA GCC CTG ATG GG	

Tab. 1: Bezeichnungen und Sequenzen der verwendeten Oligonukleotide.

2.2.3 Vektoren

Alle verwendeten Vektoren sind in Tabelle 2 aufgelistet.

Plasmid	Bemerkungen	Herkunft
pCR2.1-TOPO	<i>lacZ</i> , <i>Amp^R</i> , <i>Kan^R</i> ,	Invitrogen
pYES2.1/V5-His	<i>gal1</i> , <i>Amp^R</i> , <i>URA3</i>	Invitrogen
pJC316	<i>lacZ'</i> , <i>Amp^R</i> , <i>HIS3</i> , <i>CEN6</i> , <i>ARSH4</i> , HA-HAC1	I. Halama (Cox and Walter 1996)
PMT4	<i>lacZ</i> , <i>Amp^R</i>	O. Ernst (Ferretti et al. 1986)

Tab. 2: Bezeichnung, Genotyp und Herkunft der verwendeten Plasmide

2.2.4 Gelelution und Reinigung von DNA Fragmenten

Die Extraktion von DNA aus Agarosegelen erfolgte mit dem Invisorb[®] Spin DNA Extraction Kit (Invitex) gemäß Herstellerangaben.

2.2.5 Plasmidisolation aus *E. coli*

Zur DNA-Schnellaufarbeitung wurden die Kolonien über Nacht bei 37°C in 3 ml ampicillinhaltigem LB-Medium (100 µg/ml) auf dem Rundschüttler bei 120 rpm in sterilen Reagenzgläsern angezüchtet. Die Plasmidisolation erfolgte gemäß Vorschrift mit dem Invisorb[®] Spin Plasmid Mini Kit (Invitex). Plasmid-DNA aus 1,5 ml Kultur wurde in 50 µl Elutionspuffer aufgenommen.

2.2.6 DNA Fällung und Sequenzierung

DNA-Sequenzierungen wurden von der Firma Agowa (Berlin) durchgeführt. Dazu wurden 50µl Vektor-DNA in 300 mM NaOAc, pH 5,8 und 70% (v/v) Ethanol durch Inkubation für einige Stunden bei -20°C gefällt, anschließend durch Zentrifugation bei 14000x g für 15 min pelletiert und getrocknet.

2.2.7 Agarose- Gelelektrophorese

Die Trennung von DNA-Molekülen erfolgte mit Hilfe der Agarose-Gelelektrophorese. Für die Elektrophorese wurden 1-3-prozentige Gele (Agarose von PeqLab) verwendet und im i-MUPID-System (COSMO Bio Co., Ltd.) bei 50 V für 20-40 min laufen gelassen. Die Färbung erfolgte mit SYBR[®] Green I (bei DNA) oder SYBR[®] Green II (bei RNA) (Molecular Probes). DNA- und RNA-Banden wurden unter UV-Licht bei 300 nm visualisiert.

2.2.8 Transformation von *S. cerevisiae*

Eine 50ml-Kultur des zu transformierenden *S. cerevisiae* Stammes wurde bis zu einer OD₆₀₀ von 1,0 (ca. 5×10^7 Zellen/ml) angezüchtet und bei 3000x g für 5 min zentrifugiert. Die Zellen wurden mit 10 ml eiskaltem Wasser und 10ml eiskaltem 1M Sorbitol gewaschen, in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt und pelletiert. Das Pellet wurde mit wenig 1M Sorbitol resuspendiert, 40 µl davon in eine in EQUIBIO Elektroporationsküvette (2mm Elektrodenabstand; PeqLab, Erlangen) überführt, 0,5 µg Vektor-DNA zugegeben und für 5 min auf Eis inkubiert. Die Elektroporation erfolgte bei 1500 V, 25 µF und 200 Ω im Gene Pulser[®] (Biorad, München). Anschließend wurde 1 ml 1M Sorbitol zum Ansatz zugegeben, dieser in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und die Zellen pelletiert (30 Sekunden, 17900x g). Der Überstand wurde bis auf ca. 100 µl entfernt, das Zellpellet resuspendiert und auf Selektivmedium ausplattiert. Die Inkubation erfolgte für 3-5 Tage bei 30°C.

2.2.9 Generation verschiedener DPAP-B-Substrate für *in vitro* Translation

Mit den Primern 5'-DP-His-HA, 5'-DP-HA und 3'-DP600 wurden durch PCR aus genomischer Hefe-DNA Fragmente mit den ersten 600 Aminosäuren der Dipeptidyl-Aminopeptidase B generiert, die einen N-terminalen His-Tag oder His-HA-Tag besitzen. Substrate verschiedener Länge konnten durch entsprechende 3'Primer (z.B. 3'-DP90 und 3'-DP120) hergestellt werden. Zur Generierung einer *in vivo* Stoppkassette wurden Fusions-Konstrukte von trunkiertem DPAP-B und Sequenzen aus der 5'-UTR und dem 3'-Bereich des *HAC*-Gens hergestellt. Hierbei wurde ein Fragment, das für die ersten 90 Aminosäuren von DPAP-B und einen HA-Tag codiert, zwischen den 5'-UTR-Bereich und die Stoppsequenz aus dem 3'-Bereich des *HAC*-Gens kloniert. Dazu wurden zunächst zwei Fragmente generiert, die dann über eine BamH1-Schnittstelle ligiert wurden. Das erste Fragment, HAC-DP90, wurde

durch die Primer 5'-opt-HAC und 3'-DP90-BAM hergestellt. 5'-opt-HAC enthält einen T7-Promoter, die HAC-5'-UTR sowie eine für Hefe optimierte Promotersequenz *upstream* des Startcodons und codiert für den HA-Tag. Der Primer 3'-DP90-BAM führt eine BamHI-Schnittstelle *downstream* der DP90-Sequenz ein. Das zweite Fragment, HAC-CAS, das die Stoppkassette enthält, wurde mit dem *Template* pJC316 durch PCR mit den Primern 5'-HAC-CAS-BAM und 3'-HAC-CAS generiert. Der Primer 5'-HAC-CAS-BAM enthält die 31 letzten Nukleotide des 5'-Exons von *HAC* und 5'-Sequenzen der *HAC*-Introns. Zudem wird eine Mutation im Loop der 5'-Spleiß-Stelle eingeführt (G885C-Mutation). Der Primer 3'-HAC-CAS enthält 29 Nukleotide des 3'-Exons von *HAC* und 3'-Intronsequenzen. Er führt eine Mutation im Loop der 3'-Spleißsite (G1107C-Mutation) ein.

Beide Fragmente, HAC-DP90 und HAC-CAS wurden mit der Restriktionsendonuklease BamHI verdaut und dann über die BamHI-Schnittstelle ligiert. Für den BamHI-Verdau wurden je 3 µl DNA aus den PCR-Reaktionen (entspricht 2-3 µg) verwendet. Der Verdau wurde gemäß Herstellerangaben (New England Biolabs) in einem 20 µl-Ansatz für 45 min bei 37°C, und eine Hitzedeaktivierung des Restriktionsenzym für 20 min 80° durchgeführt. Zur Ligation der Fragmente mit T4-DNA-Ligase (New England Biolabs) wurden je 3 µl DNA (300-450 ng) aus den Restriktionsansätzen verwendet. Die Ligation erfolgte über Nacht bei 16°C. Das Ligationsprodukt wurde dann mit den Primern T7 und 3'-HAC-CAS amplifiziert.

2.2.10 Generation von Opsin-Substraten verschiedener Länge

Zur Herstellung von Opsin-Substraten wurde ein N-terminaler His-Tag, gefolgt von einem HA-Tag mit Hilfe des Primers 5'-His-Ha-Ops eingeführt. Der Primer enthält zudem dieselbe *leader*-Sequenz wie die DPAP-B-Konstrukte, da bekannt war, dass diese im Weizenkeimsystem sehr effizient ist (Halic, Becker et al. 2004). Die überlappende Sequenz mit dem Opsin-Gen *RHO* spart die ersten zwei Codons aus, da das zweite Codon für ein Asparagin codiert, das post-translokational glycosyliert wird. Da die Möglichkeit bestand, dass dies zu Problemen bei der Detektion eines N-terminalen Tags führen kann, sollten Substrate ohne diese Glycosylierungsstelle generiert werden. Substrate verschiedener Länge wurden durch PCR vom *Template* pMT4, einem Plasmid, das die codierenden Sequenzen für bovines Opsin enthält, dem Primer 5'-His-Ha-OPS und entsprechenden 3'-Primern (s. Tab. 1) hergestellt. Zu Auswahl der Längen vgl. Kap. 3.5.

2.3 Proteinbiochemische Methoden

2.3.1 Aufschlussverfahren von Hefezellen

Für präparative Zwecke wurden die Hefezellen, je nach den Anforderungen der darauf folgenden Anwendungen, nach dem Zymolyase-Verfahren (Waters and Blobel 1986) oder mechanisch unter der Verwendung einer French Press aufgeschlossen. Das Zymolyase-Verfahren ist ein sehr mildes Aufschlussverfahren und wurde zur Herstellung von Hefe-Translationsextrakten (YTEs) verwendet. Dabei werden die Hefezellen mit Zymolyase (MP Biomedicals) sphäroblastiert und anschließend mit dem Glas-Glas-Handhomogenisator (Fischer Scientific) mit weitem Stempel lysiert.

Hefezellen in 10l YPD-Medium wurden bis in die späte logarithmische Phase (1,5-1,8 OD/ml,) kultiviert. Die Zellen wurde pelletiert (10 min, 3000x g) und zuerst mit eiskaltem Wasser, dann mit eiskalter 1% KCl-Lösung (dient zur Desaktivierung von Proteasen) gewaschen und gewogen. Zur partiellen Verdauung der Zellwand wurden die Zellen dann bei RT für 15 min mit 100 mM Tris, pH 8,5, 14 mM β -Mercaptoethanol inkubiert und pelletiert. Um die Osmolarität nach der Sphäroblastierung zu erhalten, wurden die Zellen zu einer Konzentration von 0,3 g/ml in YPD-Sorbitol-Lösung (50g/l YPD, 1 M Sorbitol) resuspendiert und danach mit Zymolyase (0,625 mg/l) behandelt. Die Zymolyasereaktion wurde für 60 min bei 30°C im Wasserbad durchgeführt und dabei alle 5 min von Hand leicht geschüttelt. Nach kurzer Inkubation auf Eis wurden die Sphäroblasten pelletiert und anschließend 3 Mal mit eiskaltem YPD-Sorbitol und einmal mit eiskaltem 1 M Sorbitol gewaschen. Sollte ein Translationsextrakt hergestellt werden, wurden die Zellen vor dem Waschschrift mit 1 M Sorbitol für weitere 60-90 min bei 30°C inkubiert, um die Stoffwechselaktivität zu regenerieren (*recovery*). Zur Lysis wurden die sphäroblastierten Zellen dann vorsichtig in möglichst wenig Lysispuffer (20 mM HEPES/KOH, pH 7,5, 100 mM KOAc, 5 mM $\text{Mg}(\text{OAc})_2$, 14 mM β -Mercaptoethanol, 0,5 mM PMSF, 125 mM Sukrose, 1% pill/ml) aufgenommen (5 g/ml Zellen) und dann mechanisch mit dem Handhomogenisator lysiert. Das Lysat wurde sofort zu einem zytosolischen Zellextrakt (S100-Extrakt) aufgearbeitet.

Das French-Press-Verfahren wurde für Protein-Präparationen in großem Maßstab gewählt. Bei Lysatvolumina von 10-30 ml wurde der Aufschluss der Hefezellen in der *French[®] Pressure cell* (AMINCO, 40000 psi-Zelle) durchgeführt. Für größere Volumina wurde ein Hochdruck-Homogenisator (EmulsiFlex[®]-C5 High Pressure Homogenizer, Avestin) eingesetzt. Hefezellen wurden hier bis zu einer Konzentration von 6 OD/ml kultiviert. Die

Aufarbeitung der Zellen erfolgte dann bis zum Tris/DTT-Schritt analog zum Zymolyase-Verfahren. Danach wurden die Zellen in Lysispuffer aufgenommen und entweder bei 1000 psi bis zu dreimal in der French-Press-Zelle oder bei 20000 psi durch den Hochdruck-Homogenisator aufgeschlossen.

2.3.2 Herstellung zytosolischer S100-Extrakte und Vesikel rauher ER-Membranen

Die Hefe-Lysate wurden für 15 min bei 30000x g (Beckman Zentrifuge, SS34) und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde dann bei 100000x g und 4°C je nach Volumen im TLA 100.3-Rotor an einer Beckman-Tischultrazentrifuge oder in einem Ti70-Rotor an einer Beckman-Ultrazentrifuge zentrifugiert. Die obere Lipidschicht wurde vorsichtig abgenommen und der klare Überstand gesammelt. Es handelt sich hierbei um den S100-Extrakt, der Ribosomen und lösliche Proteine enthält. Das Pellet enthält Mikrosomen und ER-Membranen, die für die Präparation von Proteinen aus der ER-Membran verwendet wurden. Der Proteingehalt der Membranen wurde photometrisch in 1% SDS bestimmt.

2.3.3 Herstellung von Hefe-Translationsextrakten (*yeast translation extract*, YTE)

YTEs wurden aus den Stämmen SRP68prA (Beckmann, Spahn et al. 2001) und Δ Ski7 (Open Biosystems) nach einem zuvor beschriebenen Protokoll (Waters and Blobel 1986) hergestellt. Zur Herstellung von Translationsextrakten wurden Hefezellen nach der milden Zymolyase-Methode aufgeschlossen und anschließend ein S100-Extrakt hergestellt. Dieser wurde dann auf eine PD-10-Gelfiltrationssäule (Amersham Pharmacia Biotech) aufgetragen. Die Säule wurde zuvor mit 3x 5 ml TE-Puffer (20 mM HEPES/KOH, pH 7,5, 100 mM KOAc, 2 mM Mg(OAc)₂, 2 mM DTT, 0,5 mM PMSF, 10% Glycerol) äquilibriert und dann 2,5 ml des S100-Extraktes aufgetragen. Niedermolekulare Substanzen wie z.B. Aminosäuren wurden durch Zugabe von 0,75 ml TE-Puffer eluiert und verworfen. Der YTE wurde schließlich durch Zugabe von 2 ml TE-Puffer von der Säule eluiert und in 15 ml PP-Röhrchen (Greiner Bio-One) gesammelt. Um endogene mRNA zu entfernen, musste der Translationsextrakt mit S7-Nuklease (Roche) behandelt werden. Da die Mengen an mRNA in den Extrakten verschieden sein können, mussten diese mit S7-Nuklease titriert werden. Dazu wurden Aliquots von je 100 µl YTE mit 100 mM CaCl₂ auf eine Endkonzentration von 0,8 mM CaCl₂ gebracht und 10-300 U/ml S7-Nuklease zugegeben. Nach 15 min Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Nuklease-Reaktion durch Zugabe von 2 µl 100 mM EGTA

gestoppt. Die Aktivität des YTE wurde dann in IVT-Reaktionen und anschließendem Western Blot-Nachweis der translatierten Substrate abgeschätzt. Da die S7-Nuklease auch ribosomale RNA angreifen könnte, wurde für die Behandlung des gesamten Extraktes eine möglichst geringe Nuklease-Konzentration bei zugleich möglichst hoher Translationsaktivität gewählt.

2.3.4 *In vitro* Transkription

Zur Herstellung von gecappter mRNA wurde das mMessage mMachine™ Kit (Ambion) verwendet. Die Reaktionen wurden mit 1-5 µg DNA in einem Volumen von 20 µl durchgeführt und für mehrere Stunden bei 37°C inkubiert. Die mRNA wurde dann mit LiCl für mindestens eine Stunde bei -20°C gefällt, mit 70% Ethanol gewaschen und mittels Agarose-Gelelektrophorese analysiert.

2.3.5 *In vitro* Translation (IVT)

Um RNA-Sekundärstruktur zu denaturieren, wurde mRNA für 5 min bei 65°C erwärmt und sofort auf Eis gestellt. Bei IVT-Reaktionen wurde die mRNA bei einer Endkonzentration von 0,02-0,2 mg/ml eingesetzt und in 100 µl PCR-Reaktionsgefäßen in einem geringen Volumen (1-8 µl) vorgelegt. Die Translation wurde dann durch rasche Zugabe eines translationskompetenten Mastermixes, der Aminosäuren, tRNAs sowie ein energieregenerierendes System enthält, gestartet. Die IVT-Reaktionen wurden in Volumina von 25-100 µl je nach Art des verwendeten Extraktes und der zu translatierenden mRNA für 10-75 min bei 17-27 °C durchgeführt und durch Zugabe von Cycloheximid gestoppt.

Bei IVTs in Hefe wurde ein translationskompetenter Mastermix bestehend aus Hefe-Translationsextrakt (YTE), E-Mix, (ATP, GTP, beide Roth; Kreatinphosphat, Kreatinphosphat-Kinase und tRNAs, alle Roche), Aminosäuremix (Promega), 1M Tris/HCl, pH 7,0, RNase-Inhibitor (ANTI-RNase, Promega) sowie Kompensationspuffer zu einer Endkonzentration von 20 mM HEPES/KOH, pH 7,5, 150 mM KOAc, 2,5 mM Mg(OAc)₂, 2 mM DTT, 20 mM Kreatinphosphat, 1 mM ATP, 0,5 mM GTP, 0,1 mg/ml Kreatinphosphat-Kinase, 0,1 mg/ml tRNA, 3,3% Glycerol, 0,1 mM Aminosäuremix, 0,2 U/ml ANTI-RNase hergestellt. Translationsreaktionen wurden mit Extrakten aus dem Stamm SRP68prA für 75 min bei 17°C, mit Extrakten aus dem Stamm ΔSki7 für 45 min bei 25°C durchgeführt. Die Translationseffizienz wurde durch Titration der mRNA optimiert.

Für die IVT-Reaktionen mit Weizenkeim-Lysat wurde das Weizenkeim-IVT-System (Wheat Germ IVTTM) von Ambion nach Angaben des Herstellers verwendet.

2.3.6 Präparation von *ribosome nascent chains* (RNC)

Programmierte Ribosomen wurden durch IVT vom mRNAs hergestellt, denen ein Stopcodon fehlt und die für einen N-terminalen HA- und/oder His-Tag codieren. Die Reinigung der Ribosomen mit naszierender Polypeptidkette erfolgte dann mittels Affinitätschromatographie an einer Affinitätssäule (TALONTM Metal Affinity Resin, Clontech). RNCs wurden sowohl aus dem Hefesystem als auch aus dem Weizenkeimsystem isoliert. Dazu wurden 12x 100µl IVT-Reaktionen durchgeführt und diese mit 2 µl 10mg/ml Cycloheximid gestoppt. Je 3x 100 µl Reaktionen wurden auf 4x 600 µl eines Hochsalz-Sukrosekissens (50 mM Tris/HCl, pH 7,0, 500 mM KOAc, 25 mM M Mg(OAc)₂, 5 mM β-Mercaptoethanol, 1 M Sukrose, 10 µg/ml Cycloheximid, 0,1% (w/v) Nikkol (Sigma-Aldrich)) aufgetragen und bei 355000x g für 45 min im TLA100.2-Rotor zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt und die ribosomalen Pellets vorsichtig in 750 µl eiskaltem 250-Puffer (50 mM Tris/HCl, pH 7,0, 250 mM KOAc, 25 mM M Mg(OAc)₂, 5 mM β-Mercaptoethanol, 250 mM Sukrose, 10 µg/ml Cycloheximid, 0,1% (w/v) Nikkol, 0,1 U/µl ANTI-RNase) resuspendiert und für 45 min auf Eis inkubiert. Für die Affinitätschromatographie wurden zunächst 2x 1ml TALONTM Metal Affinity Resin mit 5 ml 250/tRNA-Puffer (250-Puffer + 10 µg/ml tRNA-Mix) äquilibriert, dann je 1,5 ml der Ribosomen-Suspension aufgetragen und zur Bindung der RNCs für 10 min bei RT am rotierenden Rad inkubiert. Das Säulenmaterial wurde mit 15 ml 250-Puffer und 3,75 ml 500-Puffer (250-Puffer mit 500 mM KOAc) gewaschen, um unspezifisch gebundene Ribosomen zu entfernen. Die RNCs wurden dann mit 3,75 ml 100 mM Imidazol, pH 7,1 in 250-Puffer eluiert und durch 500 µl eines Hochsalz-Sukrosekissens bei 355000x g für 45 min zentrifugiert. Um die vorzeitige Resuspendierung der RNCs zu vermeiden, wurde der Überstand so schnell wie möglich entfernt, das kaum sichtbare Pellet mit 25-50 µl Gridpuffer (20 mM Tris/HCl, pH 7,0, 50 mM KOAc, 10 mM M Mg(OAc)₂, 1 mM DTT, 125 mM Sukrose, 100 µg/ml Cycloheximid, 0,05% (w/v) Nikkol, 0,2 U/µl ANTI-RNase) resuspendiert und für 45 min auf Eis inkubiert. Die gereinigten RNC wurden in 5 µl-Aliquots in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C aufbewahrt.

Die Analyse der RNC-Präparationen erfolgte durch SDS-PAGE und Western Blot unter Verwendung eines monoklonalen Anti-HA-Antikörpers.

2.3.7 Präparation von 80S-Ribosomen aus S100-Extrakt

S100-Extrakt aus Hefe wurde mit Puromycin unter Hochsalzbedingungen (Endkonzentration 20 mM HEPES/KOH, pH 7,5, 500 mM KOAc, 25 mM Mg(OAc)₂, 1 mM DTT, 0,5 mM PMSF, 1 M Sukrose, 0,5 mM Puromycin, 0,2 U/μl ANTI-RNase) behandelt. Bei diesem Schritt wurden alle gebundenen Faktoren, naszierende Polypeptidketten und tRNAs entfernt. Die Ribosomen wurden durch Zentrifugation durch ein Hochsalz-Sukrosekissen (20 mM HEPES/KOH, pH 7,5, 500 mM KOAc, 7,5 mM Mg(OAc)₂, 1 mM DTT, 0,5 mM PMSF, 1 M Sukrose) für 45 min bei 355000x g in einem TLA100.2-Rotor pelletiert. Das ribosomale Pellet wurde in Puffer A (20 mM HEPES/KOH, pH 7,5, 100 mM KOAc, 5 mM Mg(OAc)₂, 1 mM DTT, 125 mM Sukrose) resuspendiert und durch einen 10-40% Sukrose-Gradienten (unter denselben Pufferbedingungen wie in Puffer A) für 94 min bei 370000x g (60000 rpm) in einem SW60 Rotor sedimentiert. Die 80S-Fraktion wurde nach Visualisierung durch UV-Licht am Gradientenfraktionierer gesammelt, durch Zentrifugation für 45 min bei 355000x g pelletiert und in Puffer R (20 mM HEPES/KOH, pH 7,5, 100 mM KOAc, 5 mM Mg(OAc)₂, 1 mM DTT) resuspendiert. Die Qualität der Ribosomen wurde durch Agarose-Gelelektrophorese und SDS-PAGE überprüft.

2.3.8 Präparation von eEF3 aus S100-Extrakt

Der Elongationsfaktor eEF3 ist ein lösliches Protein und wurde aus Hefe nach Herstellung eines zytosolischen S100-Extraktes gereinigt. Dazu wurde eEF3 als Fusionsprotein mit einem C-terminalen His-Tag im Hefe-Expressionstamm WCGa (Heinemeyer, Trondle et al. 1994) überexprimiert und mittels Affinitätschromatographie an TALONTM Metal Affinity Resin gereinigt.

Die Äquilibrierung des Säulenmaterials erfolgte durch Waschen von 250 μl Säulenmaterial mit 1 ml Waschpuffer (50 mM Tris/HCl, pH 7,0, 250 mM KOAc, 2,5 mM Mg(OAc)₂, 10% Glycerol, 0,01% Nikkol, 5 mM β-Mercaptoethanol). Zur Bindung von eEF3-Xa-His₁₀ wurden 2 ml des S100 aufgetragen und für 10 min bei RT am rotierenden Rad agitiert. Um unspezifisch bindende Proteine loszuwerden, wurde das Säulenmaterial mit 40 ml Waschpuffer und 20 ml Hochsalz-Waschpuffer (50 mM Tris/HCl, pH 7,0, 500 mM KOAc, 2,5 mM Mg(OAc)₂, 10% Glycerol, 0,005% Nikkol, 5 mM β-Mercaptoethanol) gewaschen. Gebundenes eEF3-Xa-His₁₀ wurde dann mit 5x 250 μl Elutionspuffer (50 mM Tris/HCl, pH 7,0, 250 mM KOAc, 2,5 mM Mg(OAc)₂, 10% Glycerol, 0,01% Nikkol, 5 mM β-

Mercaptoethanol, 100 mM Imidazol) eluiert. Zur weiteren Reinigung des eEF3-Xa-His₁₀ wurde eine Gelfiltration an einer ÄKTA-FPLC durchgeführt. Um eventuell auftretender Aggregation vorzubeugen, wurden die vereinigten Eluate zunächst bei 750 mM KOAc, 15% Glycerol und 0,01% Nikkol äquilibriert und für 30 min bei 17900x g, 4°C an der Tischzentrifuge zentrifugiert. 200 µl davon wurden für die Gelfiltration über eine vorher mit Gelfiltrationspuffer (50 mM Tris/HCl, pH 7,0, 200 mM KOAc, 5 mM Mg(OAc)₂, 10% Glycerol, 0,01% Nikkol, 5 mM β-Mercaptoethanol) äquilibrierte Gelfiltrationssäule (Superdex200 HP10/30) eingesetzt. Eluate wurden in 500 µl-Fraktionen gesammelt. Die Qualität des gereinigten eEF3 wurde durch SDS-PAGE überprüft.

2.3.9 Reinigung des trimeren-Sec61-Komplex aus Hefe-Mikrosomen

Der trimere Sec61-Komplex ist ein Protein der ER-Membran. Zur Reinigung wurde der Hefe-Stamm Sec63prA verwendet, in dem Sec63p genomisch mit durch Faktor Xa abspaltbarem ProteinA getaggt ist. Sec63 ist eine Komponente des heptameren Sec-Komplexes, der den trimeren Sec61-Komplex sowie die Proteine Sec62, Sec63, Sec71 und Sec72 enthält. Die Reinigungsstrategie bestand darin, zunächst den heptameren Sec-Komplex aus Mikrosomen durch Bindung des Sec63-Xa-Protein A-Fusionsproteins an immobilisiertes IgG zu isolieren und dann den trimeren Sec61-Komplex selektiv mit Triton-X100 herauszulösen (Beckmann, Bubeck et al. 1997).

Zur Isolierung des trimeren Sec61-Komplexes wurden die Membranen/Mikrosomen zunächst unter Hochsalzbedingungen mit Digitonin (Calbiochem) solubilisiert. Digitonin ist ein mildes Detergenz, das vorwiegend mit Cholesterin interagiert, wodurch viele Membranproteinkomplexe intakt bleiben und nicht dissoziieren. Die Solubilisation wurde bei einer Konzentration von 30-40 A₂₈₀/ml und 2% (w/v) Digitonin unter Solubilisationsbedingungen (20 mM HEPES/KOH pH 7,5, 750 mM KOAc, 2,5 mM Mg(OAc)₂, 400 mM Sukrose, 0,5 mM EDTA, 1 mM DTT, 100 µM PMSF) durchgeführt. Dazu wurde der Ansatz mit einem Handhomogenisator homogenisiert und für 30 min auf Eis inkubiert. Unlösliche Aggregate wurden durch Zentrifugation in Ti70-Rotor bei 118000x g für 32 min pelletiert. Der Überstand wurde 1:1 mit 2-fachem Verdünnungspuffer (40 mM HEPES/KOH, pH 7,5, 5 mM Mg(OAc)₂, 800 µM Sukrose) verdünnt, in 50 ml Falcon-Röhrchen überführt und mit 250 µl IgG-Sepharose (hergestellt durch Kopplung von Kanninchen-IgG (MP Biomedicals) an CNBr-aktivierte Sepharose 4B (Pharmacia Biotech) pro 50 ml Solubilisat versetzt. Die Bindung an die IgG-Sepharose erfolgte im *Batch*-

Verfahren durch Inkubation über Nacht bei 4°C am rotierenden Rad. Danach wurde die IgG-Sepharose bei 1000x g für 5 min an einer Centra CL2 Zentrifuge pelletiert und der Überstand abgesaugt. Die IgG-Sepharose wurde in eine PolyPrep[®]-Chromatographie-Säule (Biorad) überführt und mit dem 20-fachen Säulenvolumen von Wasch-Lipid-Puffer (20 mM HEPES/KOH pH 7,5, 100 mM KOAc, 2,5 mM Mg(OAc)₂, 10% Glycerol, 1,5 mM DTT, 0,3 mg/ml Phospholipide (Sigma-Aldrich), 0,3% Digitonin) gewaschen. Der trimere Sec61-Komplex wurde dann mit 4 Säulenvolumina Elutionspuffer (20 mM HEPES/KOH pH 7,5, 200 mM KOAc, 2,5 mM Mg(OAc)₂, 10% (w/v) Glycerin, 1 mM DTT, 1% (w/v) Triton-X100) in 4-6 Fraktionen eluiert. IgG-gebundene Proteine konnten mit 2 Säulenvolumina von saurem Triton-Puffer (100 mM Glycin/HCl, pH 2,8, 1% (w/v) Triton-X100) eluiert werden. Die Konzentrierung des Komplexes und der Detergenzaustausch von Triton-X100 nach Deoxy-BigCHAP (DBC, Calbiochem) erfolgte durch Bindung an einen Kationenaustauscher, (SP Sepharose Fast Flow, Pharmacia Biotech). Dazu wurden die Fraktionen nach der Triton-Elution, die den Sec-Komplex enthielten, vereinigt und 1:1 mit eiskaltem Wasser verdünnt. Es wurden 100 µl SP Sepharose pro ml eingesetzter Proteinlösung, aber höchstens 500 µl SP Sepharose verwendet. Vor der Zugabe wurde die SP Sepharose mit 5 Säulenvolumina ½-Elutionspuffer (10 mM HEPES/KOH pH 7,5, 100 mM KOAc, 1,25 mM Mg(OAc)₂, 5% (w/v) Glycerin, 0,5 mM DTT, 0,5% (w/v) Triton-X100), 5 Säulenvolumina Hochsalz-½-Elutionspuffer (½-Elutionspuffer mit 1,1 M KOAc) und 5 weiteren Säulenvolumina ½-Elutionspuffer äquilibriert. Die Bindung des Komplexes erfolgte im *Batch*-Verfahren durch Inkubation für 30 min am rotierenden Rad. Der Detergenzaustausch zu DBC erfolgte durch Waschen mit 25 Säulenvolumina DBC-Puffer (20 mM HEPES/KOH pH 7,5, 100 mM KOAc, 2,5 mM Mg(OAc)₂, 10% Glycerin, 1,0 mM DTT, 0,3% (w/v) DBC), die Elution des konzentrierten Komplexes erfolgte unter Hochsalzbedingungen (DBC-Puffer mit 750 mM KOAc) in 4-6 Fraktionen. Bis zur weiteren Verwendung wurde der gereinigte Sec61 Komplex in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C aufbewahrt. Die Analyse erfolgte durch SDS-PAGE.

2.3.10 *In vitro* Rekonstitution

Komplexe von leeren und programmierten 80S-Ribosomen mit den Liganden Sec61 und eEF3 wurden *in vitro* rekonstituiert. Dazu wurde 1 pmol Ribosomen mit 10-20-fachem molaren Überschuss an Liganden für 15 min bei RT und für 10 min auf Eis inkubiert. Um die Pufferbedingungen von 20 mM HEPES/KOAc, pH 7,5, 150 mM KOAc, 7,5 mM Mg(OAc)₂,

5% Glycerol, 0,001% Nikkol, 1 mM DTT, 0,1% pill/ml, 10 µg/ml Cycloheximid bei RNC-Komplexen und 0,2% DBC bei Sec61-Komplexen im Inkubationsansatz einzuhalten, wurde für jeden Rekonstitutionsansatz ein geeigneter Kompensationpuffer hergestellt.

Um die Abhängigkeit der eEF3-Bindung an 80S-Ribosomen oder RNCs von Adenosin-Nukleotiden und dem Antibiotikum Neomycin zu testen, wurden eEF3-Ribosomen-Komplexe mit entweder 500 µM ADP, 500 µM ATP oder 500 µM AMP-PNP, einem nicht hydrolysierbaren ATP-Analog sowie 100 µM Neomycin rekonstituiert.

Für Kryo-EM-Proben wurde eine Ribosomenkonzentration von 40 pmol/ml bei 10 fachem Ligandenüberschuss eingesetzt. Zu Herstellung von 4 Grids wurden 25 µl Probenlösung hergestellt.

2.3.11 Bindungstests

Um die Bindung von Sec61 und eEF3 an Ribosomen zu charakterisieren, wurden Bindungsstudien durchgeführt, bei denen ribosomengebundene Fraktionen von nicht-gebundenen Fraktionen durch Zentrifugation getrennt wurden.

Die schnellste Methode ist die Pelletierung der ribosomalen Fraktion über Sukrose-Kissen, wobei die *in vitro* Rekonstitutions-Ansätze auf 100 µl eines 750 mM Sukrose-Kissen aufgetragen und im TLA 100-Rotor bei 355000x g für 45 min zentrifugiert wurden. Danach erfolgte die Analyse von Überstand (enthält nicht-gebundenen Liganden) und Pellet (enthält ribosomale Fraktion).

Die Dichtegradienten-Zentrifugation durch einen Sukrose-Gradienten erlaubte eine bessere Trennung. Es wurden 10-40% Sukrose-Gradienten verwendet, die Trennung erfolgte durch Zentrifugation im SW60-Rotor bei 315000x g für 80 min. Sukrose-Gradienten wurden mit dem Gradient Master (BIOCOMP) hergestellt und mit dem Piston Gradient Fractionator (BIOCOMP) fraktioniert.

Bei der Gefrierröhrchen-Technik wurden spezielle Zentrifugationsröhrchen (5x41 mm, Ultra-Clear, Beckman) mit Adaptoren für den SW60-Rotor verwendet (K. Beranek, Laborgeräte + Service, Weinheim), die in flüssigem Stickstoff gefroren wurden und danach mit dem Skalpell in mehrere Fraktionen getrennt werden konnten. Hierzu wurden die Rekonstitutionsansätze auf 625 µl eines 750 mM Sukrose-Kissens aufgetragen und im SW60-Rotor für 2 h bei 39000 rpm (156000x g) getrennt.

Die Analyse der Fraktionen erfolgte bei allen Techniken nach Fällung der Proteine durch SDS-PAGE.

2.3.12 Proteaseprotektions-Experimente

Proteaseprotektion wurde verwendet, um die Translokation der naszierenden Polypeptidkette in den trimeren Sec61-Komplex zu testen. Sobald die naszierende Kette in den Kanal inseriert, ist diese nicht mehr zugänglich für externe Protease, wohingegen nicht-inserierte Polypeptidketten verdaut werden. 0,25 pmol RNCs, deren naszierende Ketten N-terminal getaggt waren, wurden zunächst in einem Volumen von 25 µl mit 10-fachem Überschuss an Sec61 unter *in vitro* Rekonstitutions-Bedingungen (s.o.) inkubiert. Die Proteasereaktion erfolgte für 30 min bei RT nach Zugabe von 2,7 µl 0,1 mg/ml Proteinase K (New England Biolabs) und wurde mit 2,5 µl 100 mM PMSF gestoppt. Die Ansätze wurden nach Proteinfällung und SDS-PAGE mittels Western Blot analysiert.

2.3.13 Proteinfällung und SDS-PAGE

Zur Fällung nativer Proteine wurden die zu analysierenden Ansätze mit Wasser auf 1 ml verdünnt und 100 µl 72% (w/v) TCA sowie 100 µl 0,15% (w/v) Natriumdesoxycholat zugegeben, bei 4°C für 20 min inkubiert und für 15 min bei 17900x g zentrifugiert. Das Pellet wurde einmal mit kaltem (-20°C) Aceton gewaschen, getrocknet und in 1x Probenpuffer gelöst. Die Auftrennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht erfolgte durch SDS-PAGE (*Sodiumdodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis*) nach Laemmli (Laemmli 1970) für 90 min bei 150 V. Standardmäßig wurden 12,5% Gele verwendet. Zur Größenbestimmung wurde Broad Range Protein Marker (New England Biolabs, P7702S) verwendet. Proteine wurden mit Coomassie Brilliant Blue R250 oder SYPRO® Orange (1:5000) (Bio-Rad) angefärbt.

2.3.14 Western Blot Analyse

His-, HA-, oder ProteinA-getaggte Proteine wurden mit Hilfe der Western Blot Analyse identifiziert. Proteine wurden nach SDS-PAGE mittels der Semi-Dry-Technik in Blotting Puffer (20% (v/v) Methanol, 48 mM Tris, 39 mM Glycin, 0.037% (w/v) SDS) auf eine Nitrocellulosemembran (Schleicher & Schüll PROTRAN® BA 83) transferiert. Das Blotting erfolgte bei 1 mA/cm² für 45 min mit der Semi-Dry-Apparatur (PeqLab). Membranen wurden mit Amidoschwarz (Merck) gefärbt. Als primäre Antikörper dienten anti-HA.11, Klon 16B12 (Babco) zur Detektion von HA-Tags und Penta-HisTM (QIAGEN) zur Detektion von His-

Tags. Vor der Zugabe der primären Antikörper wurde die Nitrocellulosemembran in Blockierlösung inkubiert, um unspezifische Antikörperwechselwirkung zu vermeiden. Als Blockierlösung diente bei Verwendung von Anti-HA-Antikörpern 5% fettfreie Milch (Skim Milk, Difco) in TBS-Puffer (50 mM Tris/HCl, pH 7,5, 150 mM NaCl), in Falle von Anti-His-Antikörpern 0,3% BSA (Serva) in TBS-Puffer. Primäre Antikörper wurden in Blockierlösung bei einer Verdünnung von 1:500–1:1000 eingesetzt. Die Inkubation erfolgte bei 4°C über Nacht. Als sekundärer Antikörper wurden HRP- (*horseraddish peroxidase*-)gekoppelte Rabbit Anti Mouse-Antikörper (RAM, DIANOVA, oder Amersham Biosciences) bei einer Verdünnung von 1:5000 in Milch/TBS verwendet und für ein bis mehrere Stunden bei RT inkubiert. Für die Chemilumineszenz-Reaktion wurde die Membran im Dunkelraum für 1 min mit ECL-Lösung (100 mM Tris/HCl, pH 8,5, 1,25 mM Aminophtalhydrazid (Luminol, Fluka), 0,2 mM Cumarinsäure (Fluka), 0,01% H₂O₂) inkubiert. Die Signal wurde mit HyperfilmTM ECL (Amersham Biosciences) detektiert.

2.4 Kryo-Elektronenmikroskopie (Kryo-EM)

2.4.1 Herstellung von Grids für Kryo-EM

Für Kryo-EM wurden standardmäßig Kupfernetzchen (Grids) von Quantifoil als Probenträger benutzt. Diese sind mit einem dicken Kohlefilm beschichtet, der runde Löcher in regelmäßigen Abständen aufweist (Lochdurchmesser 2 µm, Lochabstand 4 µm). Die Grids wurden zusätzlich mit einem dünnem Kohlefilm überschichtet. Dazu wurde der dünne Kohlefilm zuerst mit einem Bench Top Turbo IV Coating System (Denton Vacuum LLC, Morestown, NJ, USA) bei einem Vakuum von 5×10^{-6} Torr auf eine Glimmerschicht („Meica“, Plano GmbH, Wetzlar) aufgedampft, anschließend in einem Uhrglas an der Wasseroberfläche vom Glimmer abflotiert und danach auf die Grids gebracht. Um die Oberfläche des Kohlefilms hydrophil und affin für Partikel zu machen, wurden die Grids für 30-45 sec bei einem Vakuum von 0,3 mbar (*power level= high*) in einer Plasmareinigungskammer (Plasma Cleaner PDC002, Harrick, UK) ionisiert.

Zur Herstellung von Kryo-Grids wurden 3,5 µl der Probe aufgetragen, mit Hilfe des VitrobotTM (FEI, Eindhoven, NL) unter kontrollierten Bedingungen (6 °C, 100% Feuchtigkeit, 45 sec Inkubationszeit, 7,5 sec Blotting) in flüssigem Ethan vitrifiziert und bis zur weiteren Verwendung in flüssigem Stickstoff aufbewahrt (Wagenknecht, Grassucci et al. 1988).

2.4.2 Mikroskopie am Tecnai Polara F30

Mikrographen wurden an Tecnai Polara F30 Mikroskopen (RNC-Sec61-Komplex im Labor von Dr. Loachim Frank in Albany, NY, RNC-eEF3-Komplex in Berlin, Max-Planck, USN) unter Niedrigdosis-Bedingungen (20-25 Elektronen/Å² pro Sekunde) bei 300 keV und einer 39000-fachen Vergrößerung aufgenommen. Bilder von Partikeln wurden über den Löchern des Grids, also auf dünner Kohle aufgenommen. Diese Bereiche wurden visuell auf Dicke des Eises und Dicke des Kohlefilms überprüft. Aufnahmen wurden mit einer Belichtungszeit von 1 s gemacht. Bei sehr dünnem Kohlefilm wurde eine Präexposition von 0,1 s durchgeführt, um Ladungseffekte auf dem Kohlefilm bei der Belichtung zu vermeiden (*charging*).

Die Mikrographen wurden mit einem Heidelberg Trommelscanner bei einer Pixelgröße von 1,22 Å (5334 dpi) oder 1,63 Å (4000 dpi) und 16 bit Signaltiefe digitalisiert. Alle Mikrographen wurden als hochaufgelöste TIF-Files abgespeichert.

2.5 Bildverarbeitung und 3D-Rekonstruktion

Die Daten wurden mit dem SPIDER Software Paket prozessiert (Frank, Radermacher et al. 1996). Zur Bestimmung der Kontrast-Transfer-Funktion aus den gescannten Mikrographen wurde das Programm CTFFIND (Mindell and Grigorieff 2003) verwendet.

2.5.1 Berechnung von Powerspektren und Defokusbestimmung

Zunächst wurden die Defokuswerte und Powerspektren für die Mikrographen berechnet, die vor allem aus dem Signal des Kohlefilms gewonnen werden. Die Bilder der Powerspektren wurden dann auf Informationsgehalt, Drift und Astigmatismus überprüft. Für die weitere Prozessierung wurden nur Mikrographen gewählt, die keinen bzw. sehr schwachen Drift oder Astigmatismus zeigten und Information unter 10 Å enthielten.

2.5.2 Selektion der Partikel

Zur Selektion von ribosomalen Partikeln aus Bereichen mit dünner Kohle (aus dem Loch) wurden zunächst für jeden Mikrographen kreisförmige Masken generiert. Danach wurde eine automatische Selektion der Partikel durchgeführt, wobei die TIF-Bilder zunächst in SPIDER-Format konvertiert, dezimiert (erhöht Signal/Rausch-Verhältnis und verringert die

Rechenzeit) und mit den Masken multipliziert wurden, so dass nur der Bereich innerhalb des Loches für die Partikelsuche verwendet wird. Die Suchverfahren erfolgt auf der Basis einer schnellen, lokalen Korrelationsmethode (Roseman 2003). Hierbei werden Projektionen einer 3D-Referenz mittels Kreuzkorrelation im Fourierraum mit Partikeln auf dem Mikrographen verglichen. Danach wurden die Partikel zentriert und auf einheitliche Pixelwerte normalisiert. Die gefundenen Partikel wurden dann gemäß dem Kreuzkorrelationskoeffizient sortiert und mit dem Programm WEB visuell inspiziert.

2.5.3 Initiales Alignment der Partikel mit der *projection matching* Methode

Die Bilder aus der Elektronenmikroskopie entsprechen 2D-Projektionen von zufällig orientierten ribosomalen Partikeln. Ziel des Alignments war die Bestimmung der Orientierung und somit der Projektionswinkel (Eulersche Winkel) für jeden einzelnen Partikel. Hierzu wurde die Methode des *projection matching* verwendet, wobei 2D-Referenzprojektionen einer gegebenen 3D-Referenz erstellt werden, mit denen die experimentellen Projektionen verglichen werden. Die Partikel werden dann der jeweils am besten passenden Referenzprojektion zugeordnet, wodurch man Gruppen von Partikeln erhält, die dieselbe Orientierung haben.

Für das Alignment wurde zunächst das Referenzvolumen für jeden Mikrographen mit der dazugehörigen CTF multipliziert, was die Referenzprojektionen so verzerrt, dass sie den experimentellen Projektionen aus dem Mikroskop ähneln. Der zentrale Baustein für das *projection matching* stellt das SPIDER-Kommando `ap mq` dar. Dieses Kommando erlaubt eine Suche nach der besten Orientierung durch Berechnung von Kreuzkorrelationen nach Verschiebung (translationales Alignment) und Rotation (rotationales Alignment) der Partikel. Wichtige Parameter hierfür sind die Schrittweite und der Suchradius für die translationale Suche sowie der limitierende innere und äußere Radius für das Rotationsalignment. Für das initiale Alignment wurden 83 Referenzprojektionen erstellt, was einer Winkelgenauigkeit von 15° entspricht. Dabei wurde der größtmögliche Suchradius bei einer Schrittweite von einem Pixel sowie der Partikelradius (125 \AA für 80S-Ribosomen) für den äußeren Rotationsradius gewählt. Alle initialen Alignments wurden bei einer Pixelgröße von $3,26 \text{ \AA}$ und einer Boxgröße von 138 Pixeln durchgeführt.

2.5.4 3D-Rekonstruktion

Zur Vorbereitung für die 3D-Rückprojektion wurden die Originalbilder jedes Mikrographen zunächst gemäß der Translations- und Rotationsparameter aus dem initialen Alignment verschoben, gedreht und in Stapeldateien geschrieben. Zusätzlich wurden Files erstellt, die die Euler'schen Winkel (*angles-files*) und die Bezeichnung der Partikel (*select files*) für die Rückprojektion enthielten. Für die Rückprojektion wurde dann der Befehl `bp32F` verwendet. Bei diesem werden zunächst für die Partikel eines jeden Mikrographen drei 3D-Volumina generiert, ein Volumen aus allen Partikeln und 2 Volumina aus zwei unabhängigen Hälften des Datensatzes. Mit dem Befehl `tf cts` wurden dann alle Einzelvolumina CTF-korrigiert und zu 3 Gesamtvolumina addiert. Das Volumen aus dem gesamten Datensatz wurde gefiltert und als Referenz für das Refinement verwendet. Die Visualisierung erfolgte mit den Programmen IRIS EXPLORER (Numerical Algorithms Group, Inc., Downers Grove, IL) und CHIMERA (Pettersen, Goddard et al. 2004). Die Volumina aus den halben Datensätzen wurden zur Berechnung der Auflösung verwendet. Dazu wurden die beiden Halbvolumina verglichen um die Fourier Shell Korrelation (FSC) zu berechnen. Zur Bestimmung der Auflösung wurde die einer FSC von 0.5 entsprechende Raumfrequenz abgelesen und in Å umgerechnet.

2.5.5 Refinement

Das Refinement ist ein iterativer Prozess, bei dem die Partikel mit einem Referenzvolumen, das aus dem Datensatz stammt, aliniert und hinterher rückprojiziert werden. Dabei werden Winkelbeschränkungen eingeführt, die parallel zur Winkelgenauigkeit schrittweise erhöht werden. Der Befehl `ap md` erlaubt ein Alignment ohne Winkelbeschränkung, d.h die Partikel haben 360° Rotationsfreiheit mit variabler Winkelgenauigkeit. Der Befehl `ap rq` erlaubt eine beschränkte Suche auf Translationsebene mit Winkelbeschränkungen und mit dem Befehl `ap rn`, dem schnellsten Algorithmus, werden Rotationsfreiheit und Winkelgenauigkeit beschränkt.

Rückprojektionen wurden in der Regel mit dem `bp32F`-Befehl durchgeführt, der im Fourier-Raum und dadurch sehr schnell aus den 2D-Projektionen und den zugeordneten Orientierungsparametern eine 3D-Rekonstruktion berechnet. Alle 5-6 Refinementrunden wurde der `bp rp`-Befehl verwendet, welcher zwar langsamer aber mit besserer Qualität Rückprojektionen berechnet.

2.5.6 Hochauflösung ($< 10 \text{ \AA}$)

Gemäß dem Nyquist-Theorem ist die theoretische Auflösung limitiert auf die doppelte Pixelgröße. Praktisch wurde die Auflösung jedoch schon bei drei- bis vierfacher Pixelgröße limitiert. Deshalb wurde die Pixelgröße im Laufe des Refinements zunächst auf $2,44 \text{ \AA}$, dann auf $2,0 \text{ \AA}$ erniedrigt. Zusätzlich erwies es sich bei fortschreitendem Refinement als nötig, hohe Frequenzen zu gewichten, indem man das 3D-Volumen im Fourier-Raum mit einer Exponentialfunktion entsprechend einem b -Faktor multipliziert. Der b -Faktor wurde so gewählt, dass das Quadrat der Pixelgröße multipliziert mit dem b -Faktor zwischen 150 und 200 lag. Mit b -Faktor multiplizierte Volumina wurden immer visuell auf eventuell auftretende Artefakte durch Überalignment hoher Raumfrequenzen überprüft. Da durch den b -Faktor auch hochfrequentes Rauschen verstärkt wurde, was sich vor allem außerhalb der ribosomalen Dichte bemerkbar machte, wurde dieses maskiert. Des Weiteren wurde eine Defokuskorrektur durchgeführt, indem mit dem Befehl `tf crf` der Defokus aus den Einzelvolumina der Mikrographen berechnet wurde. Schließlich wurden Partikel aus Mikrographen, deren Defokuswerte nicht mehr als $250\text{-}500 \text{ \AA}$ abweichen, zu Defokusgruppen zusammengefasst und gemeinsam aliniert und rückprojiziert.

2.5.7 Sortierung

Die Sortierung ist ein wesentlicher Schritt zur Verbesserung der Auflösung der Strukturen, da Datensätze immer aus einer Mischung verschiedener Populationen bestehen, die abhängig von der Auflösung erkennbar wird. Ziel der Sortierung war es, zunächst unprogrammierte, leere Ribosomen, danach Ribosomen, die keinen Liganden gebunden haben, auszusortieren. Darüber hinaus konnte man durch die Sortierung einen großen Prozentsatz an falschen Partikeln sowie Rauschen loswerden und zudem nach den Partikeln selektieren, die insbesondere in den hohen Frequenzen Information beitragen. Die Basis für die Sortierung war der Vergleich der Korrelationskoeffizienten für die Einzelpartikel nach dem gleichzeitigen Alignment mit verschiedenen Referenzvolumina. Der Datensatz wurde dann in Unterdatensätze unterteilt. Dies geschieht durch Erstellung von Selektionsdateien, aus denen hervorgeht, welcher Partikel welcher Referenz zugeordnet wurde und entsprechend für die folgende Rückprojektion verwendet werden soll. Mit den aus der Rückprojektion erhaltenen Untervolumina wurde dann solange ein Refinement durchgeführt, bis sich die Anzahl der Partikel korrespondierend zu den jeweiligen Untervolumina stabilisiert hatte. Alle

Sortierungen wurden bei einer Pixelgröße von 3,66 Å durchgeführt und die erhaltenen Untervolumina zwischen 12 und 15 Å gefiltert, bevor sie in die nächste Sortierungsrunde als Referenz eingespeist wurden.

2.5.8 3D-Rekonstruktion des Hefe-DP120-RNC-Sec61-Komplexes

Für den DP120-RNC-Sec61-Komplex wurden drei Datensätze gesammelt. Die Anzahl der selektierten Mikrographen nach visueller Inspektion der Powerspektren und der Partikel nach automatischer Partikelsuche und visueller Inspektion sind in Tabelle 3 dargestellt. Für das initiale Alignment des ersten Datensatzes wurde das 3D-Volumen des Hefe-DP120-RNC-Sec61-Komplexes (Beckmann, Spahn et al. 2001), für den zweiten und dritten Datensatz die jeweils zu dem Zeitpunkt am höchsten aufgelösten Volumina verwendet. Alle drei Datensätze wurden zunächst unabhängig voneinander prozessiert und nach einigen Runden Refinement gegen ein leeres, inaktives 80S Ribosom (Beckmann, Spahn et al. 2001) sortiert. Die Vereinigung der Datensätze erfolgte, sobald für das Refinement gleiche Winkelbeschränkungen und Winkelgenauigkeiten erreicht waren. Die Pixelgröße wurde zunächst auf 2,44 Å und später auf 2,0 Å reduziert. Zur Isolation einer homogenen Population von Partikeln, die Sec61 gebunden haben, wurde der Datensatz zunächst hinsichtlich der Konformation des flexiblen Expansions-Segmentes ES27 und darauf auf Präsenz von Sec61 sortiert (eine detaillierte Beschreibung der Sortierungsschritte erfolgt in Kap. 3.4.2).

Datensatz-Nr.	Aufnahme-Datum	Selektierte Mikrographen	Anzahl der Partikel
1	Februar 2002	238	78289
2	April 2003	128	67399
3	September 2003	229	189632
Summe		595	335230

Tab. 3: Datensätze für die 3D-Rekonstruktion des DP120-RNC-Sec61-Komplexes

2.5.9 3D-Rekonstruktion des Hefe-eEF3-DP120-RNC-Komplexes

Für die 3D-Rekonstruktion des eEF3-DP120-RNC-Komplexes wurden insgesamt 221 Mikrographen aufgenommen, von denen nach Inspektion der Power-Spektren 135 Mikrographen zur Prozessierung verwendet wurden. Nach automatischer Partikelsuche und

visueller Inspektion wurden 98267 Partikel selektiert. Für das initiale Alignment wurde das 3D-Volumen eines Hefe-DP120-RNC-Sec61-Komplexes bei einer Auflösung von 10 Å verwendet. Nach einigen Runden Refinement wurde der gesamte Datensatz gegen leere 80S-Ribosomen sortiert. Der Datensatz wurde dabei in einen Teil mit 32782 Partikeln, die ein leeres Ribosom repräsentierten, und einen Teil mit 65484 Partikeln, die ein programmiertes Ribosom mit einer P-Stellen tRNA und eine zusätzliche Dichte für eEF3 darstellten, unterteilt. Der zweite Teil wurde dann weiter auf Anwesenheit von eEF3 sortiert. Dazu wurde eine Referenz ohne eEF3 durch Multiplikation des EF3-enthaltenden 3D-Volumens mit einer binären Maske für eEF3 erstellt. Als Resultat erhielt man einen Datensatz von 27784 Partikeln ohne eEF3 und 37700 Partikeln mit eEF3.

Für das weitere, amplitudenkorrigierte Refinement wurden alle Partikel, die ein programmiertes Ribosom repräsentierten, verwendet und die Pixelgröße sukzessive auf 2,0 Å reduziert.

2.6 Molekulare Interpretation und Docking von Kristallstrukturen

Für die molekulare Interpretation der Kryo-EM-Strukturen wurde ein finales Volumen nach Rückprojektion mit dem bp rp- Algorithmus verwendet. Es wurde in Größe, Orientierung und Position an das programmierte 80S-Hefe-Ribosom (Beckmann et al., 2001) angepasst, für das bereits molekulare Modelle existierten (Koordinaten mit PDB-Zugangscode 1K5X, 1K5Y and 1K5Z). Dann wurden mehrere Volumina mit unterschiedlichen Filterparametern und Amplitudenkorrekturen generiert und zum BRIX-Format konvertiert. Molekulare Modelle wurden mit dem Programmpaket O (Jones, Zou et al. 1991) erstellt. Zur Modellierung von rRNA wurde das Programm ERNA-3D (Mueller, Doring et al. 1995) verwendet.

2.6.1 Erstellung eines Modells für den ribosomengebundenen trimeren Sec61-Komplex.

Für die molekulare Interpretation der Elektronendichte für Sec61 wurde die Kristallstruktur des SecYEß-Komplexes aus *M.jannaschii* verwendet (PDB 1RHZ) (Van den Berg, Clemons et al. 2004). Um einen Kanal im aktiven Zustand zu simulieren, wurden die Reste von SecY, die den *Plug* darstellen (Reste 44-68) entfernt. Auf Basis des Modells für SecY im aktiven Zustand wurde durch Rotation der N-terminalen Hälfte um Gly203 in der Scharnier-Region (*Hinge*-Region, vgl. Kap. 1.8.5, Abb. 12) ein geöffnetes SecY-Monomer erzeugt. Ebenso wurde zum Vergleich die Strukturen des geöffneten *front-to-front*-Dimers aus *E.coli* (Mitra, Schaffitzel et al. 2005) und des geschlossenen *back-to-back*-Dimers (Breyton, Haase et al.

2002) gedockt. Die bei *E.coli* zusätzlichen TM-Helices von SecE und SecG wurden aus dem PDB des *front-to-front* Dimers entfernt. Zur Modellierung der ribosomalen Umgebung von Sec61 wurden die Modelle der ribosomalen Proteine rpL19, rpL25, rpL26, rpL35 sowie Modelle für die 25S-rRNA-Helices H7, H24, H50 und H53 verwendet (Spahn, Beckmann et al. 2001). Ein Modell für die Spitze von Helix 59 (Nukleotide 1866 bis 1881), die im Vergleich mit der *H. marismortui* 25S-rRNA verlängert ist, wurde in ERNA-3D erstellt. Dazu wurde eine A-Helix mit 6 Basenpaaren (Reste 1866-1871 und Reste 1876-1881) und einem Tetraloop (Reste 1872-1875) generiert. Dieses Modell wurde in korrespondierende Elektronendichte gedockt, die nicht durch rRNA von *H. marismortui* ausgefüllt wurde.

2.6.2 Erstellung eines Modells für ribosomengebundenes eEF3

Zur Interpretation der Elektronendichte für eEF3 wurde die Kristallstruktur von eEF3, sowie die molekularen Modelle für eEF3 im ADP- und ATP-Zustand (Kap. 1.5.3, Abb. 8) benutzt (Andersen et al. 2005). Zunächst wurde die gesamte ABC-Domäne einschließlich ABC1, ABC2 und Chromo-Domäne als starrer Körper in die Dichte gedockt. Die Chromo-Domäne musste dabei jedoch um 52° um die Glycine G762 and G864 gedreht und um 5 Å verschoben werden. Die HEAT-Domäne wurde in zwei Blöcke unterteilt, die die ersten fünf Helixpaare (Reste 1-200; H1-H10) und den folgenden 3 Helixpaare (Reste 201-333; H11-H16) enthielten. Diese zwei Blöcke sowie das 4-Helix-Bündel wurden dann als einzelne starre Körper in EM-Dichte gedockt. Zur Modellierung der ribosomalen Umgebung von eEF3 wurden die Modelle der ribosomalen Proteine rpL11, rpL5, rpS5, rpS18 und rpS20 sowie für die 5S-rRNA, falls nötig, als starre Körper angepasst, um die Elektronendichte besser auszufüllen. Als Vergleich wurde die 3D-Rekonstruktion des Weizenkeim-Ribosoms bei ca. 7 Å Auflösung verwendet (Halic, unveröffentlichte Daten). Die Proteine rpL5 (Reste 150-232) und rpS18 (Reste 15-83) sowie die 5S-rRNA von *H. marismortui* (Reste 31-50) wurden auf die Interaktions-Stellen mit eEF3 reduziert und trunkiert. Ein Modell für die Spitze von Helix 39 der 18S-RNA (Nukleotide 1354-1370), die im Vergleich mit der *T. thermophilus* 16S-rRNA verlängert ist (s. Kap 3.2.4, Abb. 21) wurde in ERNA-3D erstellt. Dazu wurde eine A-Helix mit 6 Basenpaaren (Reste 1354-1360 und Reste 1365-1370) und einem Tetraloop (Reste 1361-1364) generiert. Dieses Modell passte gut in die korrespondierende Elektronendichte, die nicht durch rRNA von *T. thermophilus* ausgefüllt wurde. Die im *H. marismortui* Modell fehlenden Reste für Helix76 des L1-Stalks (Reste 2134-2171 und Reste 2203-2237) wurden ebenfalls mit einer A-Helix modelliert.

3. Ergebnisse

3.1 Herstellung eines funktionalen eEF3-Ribosomen Komplexes

Um einen funktionalen eEF3-Ribosomen-Komplex zu rekonstituieren, mussten zunächst die Komponenten eEF3, 80S-Ribosomen und 80S-RNCs aus Hefe gereinigt werden. Funktionale Komplexe wurden daraufhin *in vitro* aus gereinigten Ribosomen und eEF3 rekonstituiert. Ribosomengebundene Fraktionen wurden durch Dichtegradientenzentrifugation isoliert, die Bindung von eEF3 an Ribosomen wurde mittels SDS-PAGE analysiert.

3.1.1 Reinigung von 80S-Ribosomen und von RNCs

Für Bindungsexperimente mit eEF3 wurden gereinigte 80S-Ribosomen und gereinigte DP120-RNCs aus Hefe verwendet. Die Reinigung der 80S-Ribosomen wurde wie in Kap. 2.3.7 beschrieben durchgeführt und analysiert, die Präparation von DP120-RNCs ist in Kap. 2.3.6 beschrieben und in Kap. 3.3.1 (Abb. 24) dokumentiert.

3.1.2 Reinigung von eEF3

Der *fungi*-spezifische Elongationsfaktor eEF3 konnte als Fusionsprotein mit einem durch die Protease Faktor Xa abspaltbaren C-terminalen His₁₀-Tag mittels Affinitätschromatographie und anschließender Gelfiltration gereinigt werden.

Das *YEF3*-Xa-His₁₀-Genkonstrukt konnte mittels PCR aus genomischer Hefe-DNA mit den Primern YEF3-fow und YEF3-Xa-His-rev generiert werden. Hierbei wurde mit dem Primer YEF3-fow eine für Überexpression in Hefe optimierte 5'-*upstream*-Region und mit dem Primer YEF3-Xa-His-rev eine doppelte Faktor-Xa-Schnittstelle, ein NH₂-terminaler His₁₀-Tag und ein Stopcodon eingeführt. Anschließend wurde das PCR-Fragment in den durch Galaktose induzierbaren Hefe-Expressionsvektor pYES.2.1/V5-His TOPO kloniert. Nach Plasmidpräparation wurde mittels PCR überprüft, ob das Fragment richtig herum eingebaut war. Anschließend wurden Plasmide mit korrekter Direktionalität in den Hefe-Expressionsstamm WCGa mittels Elektroporation transformiert und auf Expression von eEF3 getestet. eEF3 konnte erfolgreich überexprimiert werden.

Zur Reinigung von eEF3-Xa-His₁₀ wurde zunächst ein S100-Extrakt hergestellt (Kap. 2.3.2). Aus diesem konnte das Fusionsprotein mittels Affinitätschromatographie an einer Cobaltmatrix (TALON[®] Metal Affinity Resin, Clontech) isoliert werden (Kap. 2.3.8). Kontamination durch unspezifisch gebundene Proteine konnte weitestgehend durch intensives Waschen des Säulenmaterials mit Waschpuffer (160 Säulenvolumina) sowie einem anschließenden Hochsalz-Waschschritt (500 mM KOAc, 80 Säulenvolumina) eliminiert werden (Abb. 15a). Zur weiteren Reinigung wurde eine Gelfiltration über eine Superdex200-Säule am ÄKTA-FPLC-System durchgeführt. Vorversuche am SMART-System zeigten jedoch zunächst hohe Verluste (> 65%), was für eine Tendenz zur Aggregation des Proteins sprach. Des Weiteren gab es Verluste bei Versuchen, das Protein über Centrikonzentrifugation zu konzentrieren. Auch eine Abspaltung des His₁₀-Tags mit der Protease Faktor Xa war trotz doppelter Faktor-Xa-Schnittstelle zwischen Protein und Tag nicht möglich. Deshalb wurde vor der Gelfiltration die Salz-, Detergenz- und Glycerolkonzentration auf 750 mM KOAc, 0,01% Nikkol und 15% Glycerol erhöht, um hydrophobe Wechselwirkungen zu verhindern, und eventuell vorhandene Aggregate wurden durch Zentrifugation für 30 min bei 14000x g pelletiert. Dieser Schritt verringerte die Verluste bei der Gelfiltration beträchtlich und eEF3 konnte von Verunreinigungen und Aggregaten getrennt werden (Abb.15b). Die beiden konzentriertesten Fraktionen wurden für Bindungstests verwendet. Die Reinheit wurde nach SDS-PAGE auf ungefähr 95% geschätzt. Aus 150 ml Hefekultur konnten 300-500 µg reines eEF3 gereinigt werden.

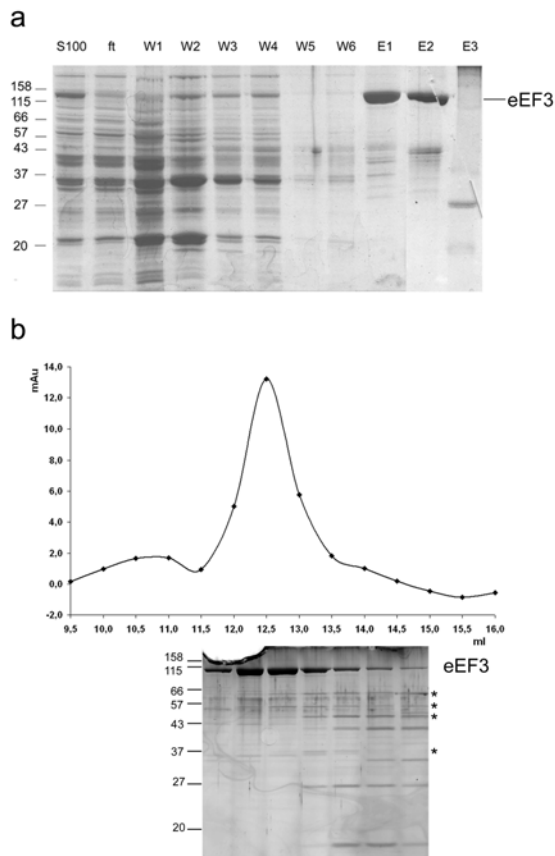


Abb. 15: Reinigung von eEF3 aus Hefe-S100-Extrakt. a, SDS-Gel nach Reinigung von eEF3-Xa-His10 aus 2 ml S100-Extrakt über 250 µl TALON® Metal Affinity Resin. Auf das Gel wurde aufgetragen: S100, Hefe S100-Extrakt; ft, Durchfluss (flowthrough), jeweils 1/400; W1-W4, Waschfraktionen mit Waschpuffer; W5-W6, Waschfraktionen mit Hochsalz-Waschpuffer (500 mM KOAc); alle Waschfraktionen 1/5 (von 10 ml); E1-E3, Imidazoleluate, jeweils 1/40 (von 250 µl). eEF3 konnte zu ca. 95% angereichert werden. b, Gelfiltration. Oben ist der Ausschnitt aus dem Elutionsprofil, der den eEF3-Peak zeigt; unten das korrespondierende SDS-Gel von 500 µl-Fractionen (1/50) aus dem eEF3-Peak. eEF3 konnte von Aggregaten und Verunreinigungen getrennt werden. Externe Kontamination (z.B. Keratin) ist mit einem Stern gekennzeichnet.

3.1.3 Rekonstitution eines stabilen eEF3-Ribosomen-Komplexes für Untersuchungen mittels Kryo-EM

Für die Rekonstitution eines stabilen eEF3-Ribosomen-Komplexes spielten folgende Überlegungen eine Rolle:

Es war bekannt, dass eEF2 und eEF3 miteinander um Bindung an das Ribosom kompetieren (Kovalchuk, Kambampati et al. 1998). In Anwesenheit von AMP-PNP bzw. GMP-PNP konnte ein im Überschuss vorliegender Faktor den anderen aus dessen ribosomaler Bindungsstelle verdrängen. Durch Zugabe des Aminoglycosidantibiotikums Neomycin konnte die eEF3-Bindung an das Ribosom verstärkt werden und die Verdrängung von eEF2

durch eEF3 ist in Anwesenheit von Neomycin bei deutlich niedrigeren eEF3-Konzentrationen möglich. Des Weiteren wird die GTPase-Aktivität und nachfolgend die Dissoziation von eEF2 vom Ribosom durch Neomycin stimuliert. Die Schlussfolgerung aus diesen Experimenten ist, dass eEF2 und eEF3 an unterschiedliche Konformationen des Ribosoms binden, wobei Neomycin möglicherweise die eEF3-affine Konformation stabilisiert. Deshalb wurde erwartet, dass die Bindung von eEF3 an Ribosomen abhängig von der Konformation des Ribosoms, von Neomycin und der Anwesenheit von Adenosinnukleotiden ist. Bindungstests wurden daher mit gereinigten 80S-Ribosomen und RNCs unter Anwesenheit verschiedener Nukleotide (ADP, ATP und AMP-PNP) und in An- und Abwesenheit von Neomycin nach der Gefrierröhrchen-Methode (Kap. 2.3.11) durchgeführt.

Wie aus Abb. 16a ersichtlich, konnte, unabhängig vom verwendeten Nukleotid, nur sehr schwache Bindung von eEF3 an 80S-Ribosomen festgestellt werden. Die Bindung konnte auch durch Zugabe von Neomycin nicht verstärkt werden. Bindet man eEF3 jedoch an RNCs (Abb. 16b) beobachtet man eine deutlich stabilere Bindung als an 80S-Ribosomen. Der Anteil an gebundenem eEF3 ist hier abhängig vom verwendeten Nukleotid und wird von der apo-Form über ADP-, ATP- zur AMP-PNP-Form größer. Neomycin vergrößert den Anteil an gebundenem eEF3 in der AMP-PNP-Form (siehe dazu auch Abb. 16d), wohingegen apo-, ADP- und ATP-Form in gleichem Maße oder etwas weniger gebunden werden. Als apo-Form wird hier in Abwesenheit von Nukleotiden gereinigtes eEF3 bezeichnet.

Unter den günstigsten Bedingungen (500 μ M AMP-PNP, 100 μ M Neomycin) wurde die Bindung von eEF3 an Hefe-RNCs mit der Bindung an Weizenkeim-RNCs verglichen. Es konnte jedoch kein eEF3 an Weizenkeim-RNCs gebunden werden (Abb. 16c).

Zur Optimierung einer Probe für Kryo-EM wurde getestet, ob und bei welchem molaren Verhältnis von eEF3 zu RNCs unter Kryo-EM-Bedingungen (2 OD/ml = 40 nM Ribosomen) eine Sättigung der Bindung eintritt. Da die naszierende Polypeptidkette von DP120-RNCs, insbesondere die hydrophobe Signalsequenz, mit der Oberfläche von EM-Grids interagieren kann, wurde diese durch Bindung von gereinigtem trimeren Sec61-Komplex im Überschuss abgesättigt. Gleichzeitig konnte durch Verwendung der Sec61-Präparation, bei der eEF1A mitgereinigt wurde (vgl. Kap. 3.3.2, Abb. 25), überprüft werden, ob eEF3 und eEF1A simultan an Hefe-RNCs binden können. Aus Abb. 16e ist ersichtlich, dass die Bindung von eEF3 an RNCs bei einem 10-fachen Überschuss an eEF3 (400 nM) gesättigt werden kann und dass eEF1A im Überstand bleibt.

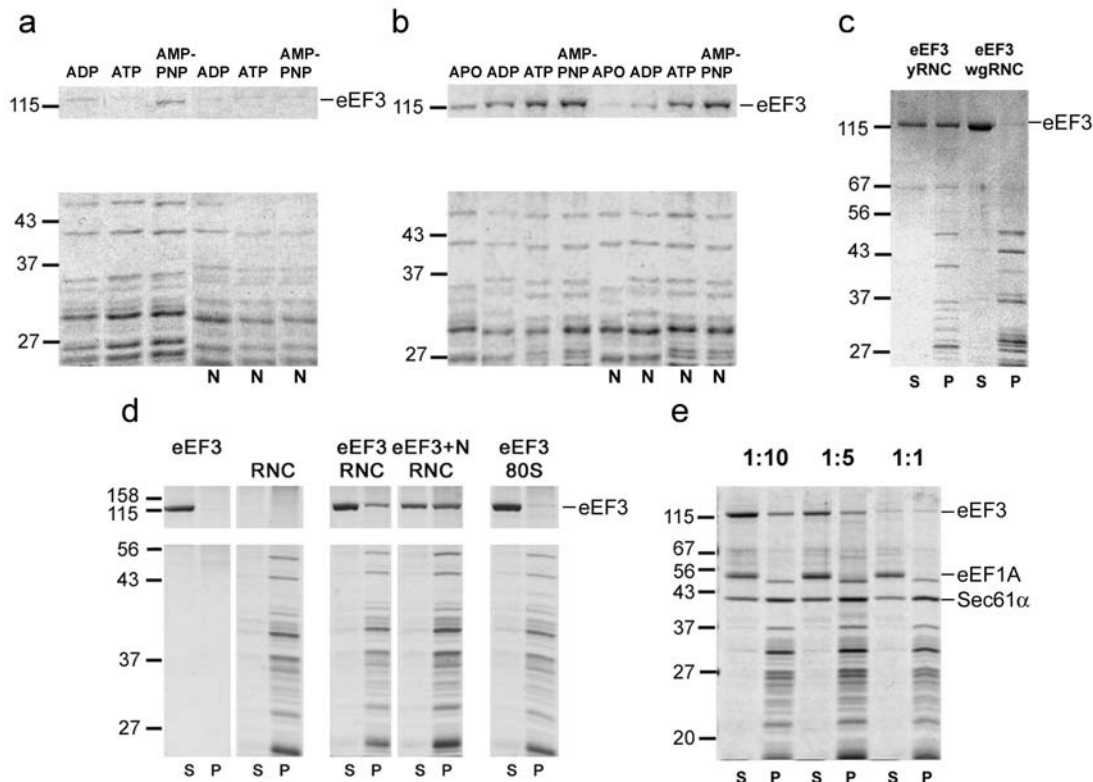


Abb. 16: Bindungstests von eEF3 an Ribosomen. Komplexe aus gereinigten 80S-Ribosomen oder RNCs mit eEF3 im Überschuss wurden *in vitro* rekonstituiert und durch Dichtegradientenzentrifugation fraktioniert. Fraktionen von Überstand- (S, supernatant) und Pellet (P) wurden über SDS-PAGE und nachfolgende Färbung mit Coomassie Brilliant Blue analysiert. a, b, Bindung von eEF3 an Hefe-80S-Ribosomen (a) und Hefe-RNCs (b) in Anwesenheit von ADP, ATP und AMP-PNP, jeweils ohne und mit Neomycin (N). Gezeigt sind nur die Pelletfraktionen. Bei den mit APO bezeichneten Proben in b wurde gereinigtes eEF3 ohne Zugabe eines Nukleotids verwendet. Im Vergleich zu leeren Ribosomen konnte ein viel größerer Anteil von eEF3 an RNCs gebunden werden und es zeigt sich hier eine eindeutige Abhängigkeit der Bindung von dem verwendeten Nukleotid. c, Vergleich der Bindung von eEF3 an Hefe-RNCs (yRNC) und Weizenkeim-RNCs (wgRNC) in Anwesenheit von AMP-PNP und Neomycin. Im Vergleich mit Hefe-RNCs kann nur ein sehr kleiner Bruchteil von eEF3 an Weizenkeim-RNCs gebunden werden. Entsprechend sind auch die Anteile von nicht-gebundenem eEF3 in den Überstand-Fractionen (S) verteilt. d, Einfluss von Neomycin (N) auf die Bindung von eEF3 an Hefe-RNCs in Anwesenheit von AMP-PNP. Zum Vergleich sind die Kontrollen (eEF3 und RNCs allein) sowie die Bindung von eEF3 an 80S-Ribosomen gezeigt. Zugabe von Neomycin erhöht den Anteil an ribosomengebundenem eEF3. e, Bindung von eEF3 an RNCs in verschiedenen molaren Verhältnissen (RNC:eEF3 = 1:1, 1:5, 1:10) und in Anwesenheit vom gereinigtem trimeren Sec61-Komplex in 10-fachem Überschuss sowie eEF1A. Die Bindung von eEF3 an RNCs kann gesättigt werden. Bei Überschuss von eEF3 sind gleiche Anteile von ribosomengebundenem eEF3 im Pellet. Die naszierende Kette der RNCs wird durch Bindung von Sec61 abgesättigt, eEF1A bleibt im Überstand.

Kryo-EM-Proben von eEF3-DP120-RNC-Sec61-Komplexen wurden in Anwesenheit von AMP-PNP und Neomycin hergestellt.

3.2 Kryo-EM-Struktur des eEF3-RNC-Komplexes

3.2.1 3D-Rekonstruktion, Sortierung und Auflösung

Nach Kryo-EM und 3D-Rekonstruktion konnte der eEF3-DP120-RNC-Sec61-Komplex erfolgreich visualisiert werden. Um eine homogene Population von eEF3-gebundenen Ribosomen zu erhalten, musste der Datensatz jedoch sortiert werden. Zunächst wurden 33% leere, nicht programmierte Ribosomen aussortiert, was in Übereinstimmung mit Werten für den DP120-RNC-Sec61-Datensatz ist (Kap. 3.4.2). An den leeren Ribosomen konnte keine Dichte für eEF3 visualisiert werden. Bei der nachfolgenden Sortierung auf Präsenz von eEF3 wurden weitere 42% des verbleibenden Datensatzes entfernt. Die finale 3D-Rekonstruktion wurde schließlich aus 37700 Partikeln (38% des gesamten Datensatzes) errechnet.

Der Komplex hat eine Auflösung von 13,3 Å (7,8 Å) bei einem Wert von 0,5 (3σ) für die FSC (Abb. 17). Trotz der relativ schlechten nominalen Auflösung sind strukturelle Details bis deutlich unter 10 Å sichtbar.

3.2.2 Übersicht über die Struktur des eEF3-RNC-Komplexes

Die 3D-Rekonstruktion hat die typische Erscheinung eines programmierten Hefe-80S-Ribosoms mit einer tRNA in der P-Stelle (Beckmann, Spahn et al. 2001) und eine zusätzliche Dichte für eEF3 (Abb. 18). Der Faktor befindet sich hierbei an einer völlig neuen Bindungsstelle am Ribosom. Er besteht aus zwei großen, globulären Domänen, die sich auf der zentralen Protuberanz der großen 60S-UE bzw. auf dem Kopf der kleinen 40S-UE befinden. Diese Domänen konnten durch Vergleich mit der Kristallstruktur eindeutig als ABC-Domäne, die ABC1, ABC2 und die Chromo-Domäne umfasst und HEAT-Domäne identifiziert werden. Der C-Terminus (Reste 976-1044) war in der Struktur nicht sichtbar und ist vermutlich unstrukturiert.

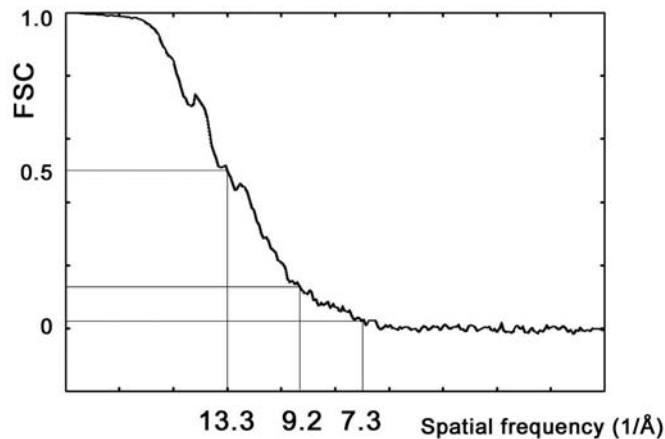


Abb. 17: Auflösungskurve für den eEF3-RNC-Komplex. Bei einer FSC von 0,5 beträgt die Auflösung 13,3 Å, gemäß dem 3σ -Kriterium 7,8 Å, gemäß dem *figure of merit*-Kriterium (FSC = 0,15) 9,2 Å.

Beim Vergleich der Teildatensätze für programmierte Ribosomen mit und ohne eEF3 konnten bei der gegebenen Auflösung keine Konformationsänderungen für das Ribosom festgestellt werden. Auch beim Vergleich mit der RNC-Sec61-Struktur wurden bei der gegebenen Auflösung keine Unterschiede in der ribosomalen Konformation, die der POST-Konformation entspricht, beobachtet.

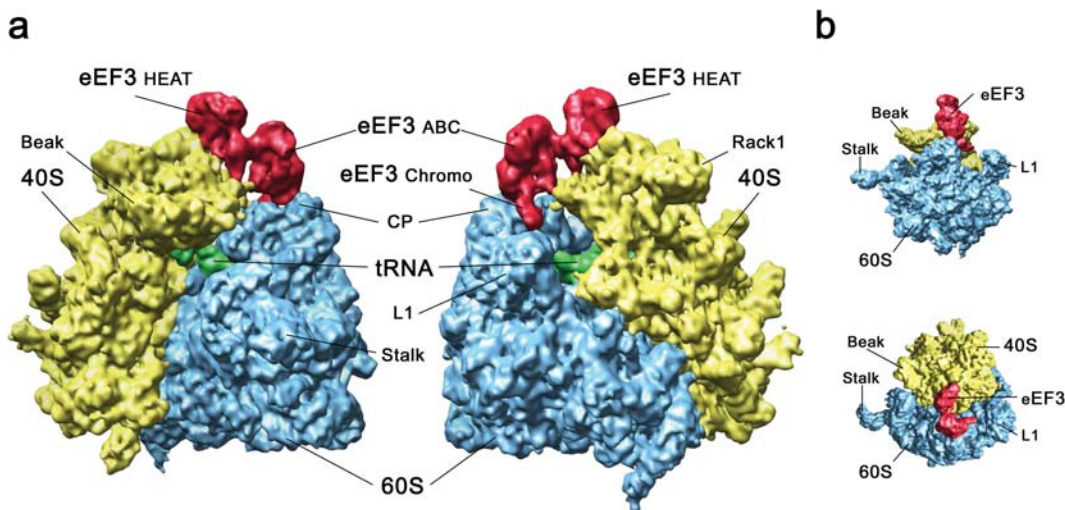


Abb. 18: Kryo-EM-Rekonstruktion des eEF3-RNC-Komplexes aus Hefe. a, Seitenansichten; die rechte Ansicht ist um 180° gedreht. Die kleine 40S-UE ist gelb, die große 60S-UE blau, tRNA in der P-Stelle grün und eEF3 rot gezeigt. Charakteristische Merkmale für 60S, 40S und eEF3 sind ebenfalls angezeigt. CP, zentrale Protuberanz (*central protuberance*); L1, L1-Protuberanz. b, wie a, so gedreht, dass die Rückseite der großen 60S-UE einmal von hinten und von oben zu sehen ist.

3.2.3 Docking der Kristallstruktur und atomarer Modelle von eEF3

Um eine Interpretation der Struktur auf molekularer Ebene vornehmen zu können, wurde die Kristallstruktur von eEF3 und daraus erhaltene Modelle für ADP- und ATP-Form (Andersen et al. 2005) in die Kryo-EM-Dichte gedockt. In Übereinstimmung mit der Tatsache, dass der eEF3-RNC-Komplex in Anwesenheit von AMP-PNP dargestellt wurde, konnte die Dichte für die ABC-Domäne am besten mit der ABC-Domäne des ATP-Modells gedockt werden (Abb. 19). Diese wurde auf Basis der ABC-Dimer-Struktur von MJ0976 erstellt, die ein geschlossenes ABC-Dimer darstellt (vgl. auch Abb. 7a). Die ABC2- und die Chromo-Domäne binden hierbei auf der zentralen Protuberanz der großen 60S-UE (Abb. 20c). Die ABC1-Domäne ist oberhalb von ABC2 und hat keinen Kontakt zum Ribosom. Die Chromo-Domäne rearrangiert sich bei der Bindung ans Ribosom und musste verschoben und gedreht werden, um in die EM-Dichte zu passen. Auffällig ist ihre Position direkt gegenüber der L1-Protuberanz der großen 60S-UE. Auch in der HEAT-Domäne ereigneten sich weit reichende Konformationsänderungen, die zunächst das Docken sehr erschwerten. Erst nach Erreichen einer Auflösung, die hinreichend war, um teilweise α -helikale Sekundärstrukturen in eEF3 erkennen zu können, war die korrekte Positionierung der HEAT-Domäne möglich. Aufgrund der Beobachtung, dass die Helices von der Seite gesehen diagonal verlaufen, wurden die ersten 5 *Repeats* der HEAT-Domäne (Reste 1-200) so positioniert, dass sie den Kopf der kleinen 40S-UE mit den Loops zwischen den helikalen *Repeats* kontaktieren (Abb. 20c). Die nachfolgenden *Repeats* (Reste 201-335) sowie das 4-Helix Bündel (Reste 336-417) mussten um ca. 15 Å bewegt werden, um die EM-Dichte auszufüllen. Der sechste *Repeat* kontaktiert hierbei den N-terminalen Teil (*Lobe1*) von ABC1. Die Evaluierung des Dockens erfolgte durch Ermittlung von Korrelationskoeffizienten zwischen der Elektronendichte und dem gedockten Modell (Tab. 4).

Domäne	Korrelations-Koeffizient
ABC-ADP (Modell)	0,56
ABC-ATP (Kryo)	0,74
HEAT (X-Ray)	0,57
HEAT (Kryo)	0,69
eEF3-ADP (Modell)	0,57
eEF3-ATP (Kryo)	0,73

Tab. 4: Evaluation des Dockens. Die molekularen Modelle wurden mit SPIDER in Elektronendichten konvertiert und Korrelationskoeffizienten mit der EM-Dichte berechnet.

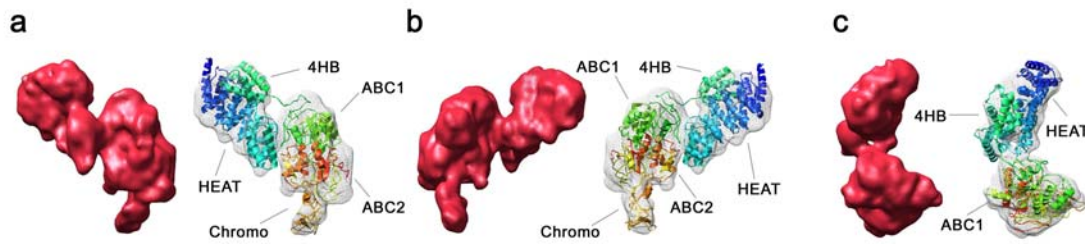


Abb. 19: Docking der Kristallstruktur von eEF3 in die isolierte Kryo-EM-Dichte. Die Ansichten sind wie in Abb. 18a und b (a, b, Seitenansichten, c, Aufsicht) gezeigt. Die isolierte Elektronendichte für eEF3 ist rot (jeweils links) oder transparent (jeweils rechts), das molekulare Modell für eEF3 in der ATP-Form (geschlossenes ABC-Dimer) ist in Regenbogenfarben als *Ribbon* dargestellt. Dabei ist die N-terminale HEAT-Domäne blau, das 4-Helix-Bündel (4HB) türkis, ABC1 hellgrün, ABC2 gelb (*lobe 1*) und rot (*lobe 2*) und die Chromo-Domäne orange dargestellt.

3.2.4 Die ribosomale Bindungsstelle von eEF3

eEF3 bindet nicht an die bekannte Elongationsfaktor-Bindungsstelle, die von den anderen Elongationsfaktoren eEF1A und eEF2 benutzt wird (vgl. Kap. 1.4). Im Gegensatz zur Bindung von eEF2, das eine intermediäre Konformation des Ribosoms nach RSR verursacht (Spahn, Gomez-Lorenzo et al. 2004), bindet eEF3 an programmierte Ribosomen, die die POST-Konformation repräsentieren (Abb. 20a). Die Bindungsstelle befindet sich in der Tat in der Nähe der ribosomalen E-Stelle, was für die Vermutung spricht, dass die Funktion von eEF3 im Zusammenhang mit der E-Stelle steht. Die Charakterisierung dieser bislang noch nicht bekannten Bindungsstelle und die Analyse der molekularen Kontakte zwischen eEF3 und dem Ribosom erfolgte durch Docking von molekularen Modellen ribosomaler Proteine und RNA. Die Interaktionspartner von eEF3 sind auf Seiten der großen 60S-UE die Proteine rpL5 und rpL11 sowie 5S-rRNA, auf Seiten der kleinen 40S-UE die Proteine rpS18, zwei weitere unbekannte Proteine, die als rpSX1 und rpSX2 bezeichnet wurden, und die Spitze von Helix 39 der 18S-rRNA (Abb. 20b, c und Abb. 22). Letztere ist in der 18S-rRNA aus Hefe verglichen mit der 16S-rRNA aus der kleinen 30S-UE von *Thermus thermophilus*, deren Struktur die Basis für das molekulare Modell war (Wimberly, Brodersen et al. 2000), um 20 Nukleotide verlängert (Abb. 21a). Die Spitze von Helix 39 wurde deshalb mit dem Programm E-RNA-3D als A-Helix mit einem Tetraloop modelliert. Dieses Modell passte sehr gut in die korrespondierende Dichte.

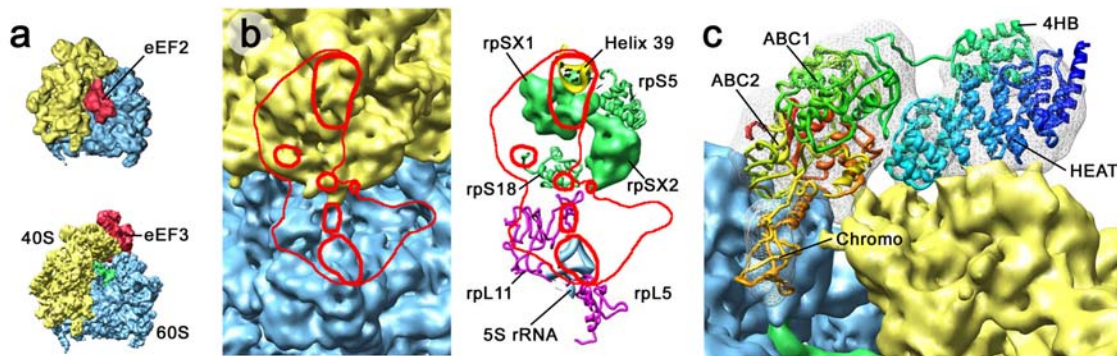


Abb. 20: **a**, Seitenansicht der Kryo-EM-Strukturen des 80S-eEF2-Sor-Komplexes (Spahn, Gomez-Lorenzo et al. 2004) (oben) und des RNC-eEF3-Komplexes (unten) aus Hefe. Die Farbcodierung ist wie in Abb. 18a. Man beachte, dass eEF3 an einer anderen Stelle des Ribosoms bindet als eEF2. **b**, Aufsicht wie in Abb. 18b (unten), die die Bindungsstelle für eEF3 zeigt. Rechts ist die ribosomale Dichte dargestellt, links ist diese durch molekulare Modelle ersetzt. Die Kontur von eEF3 ist durch eine rote Linie gekennzeichnet und Kontaktstellen zwischen eEF3 und dem Ribosom sind rot eingekreist. Die Spitze von Helix 39 der 18S-rRNA ist gelb, Proteine der kleinen 40S-UE grün, 5S-rRNA blau und Proteine der großen 60S-UE magenta gezeigt. Die unbekannten Proteine rpSX1 und rpSX2 sind als grüne Elektronendichten gezeigt. Der Übersicht wegen wurden die Proteine rpL5 (Reste 150-232) und rpS18 (Reste 15-83) trankiert. **c**, Molekulares Modell für eEF3-ATP als Seitenansicht auf die Chromo-Domäne. Die Elektronendichte für eEF3 ist als transparenter Maschendraht, das molekulare Modell wie in Abb. 19 gezeigt.

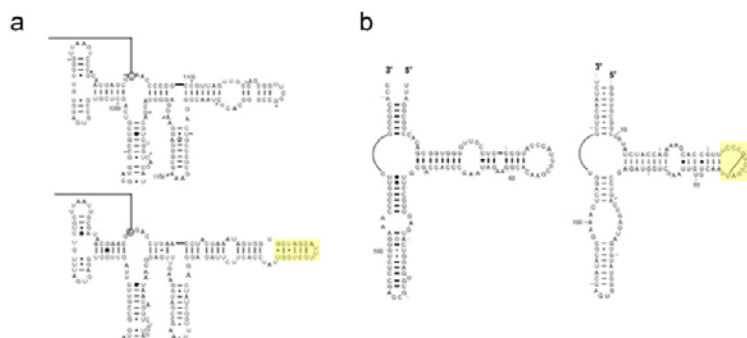


Abb. 21: **a**, Ausschnitt aus dem Sekundärstruktur-Diagramm der 16S-rRNA aus *T. thermophilus* (oben) und *S. cerevisiae* (unten) für den Bereich um Helix 39. Man beachte, dass Helix 39 in *S. cerevisiae* verlängert ist. **b**, Sekundärstruktur-Diagramm der 5S-rRNA von *H. marismortui* (links) und *S. cerevisiae*. Bereiche der rRNA, die bei der Bindung von eEF3 beteiligt sind, wurden gelb markiert. Die Diagramme stammen von <http://www.rna.icmb.utexas.edu>.

3.2.5 Molekulare Kontakte von eEF3

eEF3 ist mit der zentralen Protuberanz der großen 60S-UE durch zwei Hauptkontaktstellen verankert. Zum ersten Kontakt tragen auf Seiten von eEF3 die ersten zwei β -Faltblätter des *Lobe1* von ABC2 und die hoch konservierte Region N-terminal davon (Reste 657-662) bei. Diese Region interagiert mit der 5S-rRNA und dem Protein rpL5 (siehe Tab. 5). Der zweite

Kontakt besteht zwischen der Chromo-Domäne, der 5S-rRNA und rpL11. Die Region, welche die Hauptkontakte zur rRNA ausübt, ist die so genannte Sac7-Homologie-Region (Reste 802-808). Es wurde gezeigt, dass die *Archaeae*-Proteine Sac7d oder Sso7 über diese Region an DNA binden können (Robinson, Gao et al. 1998). Interessanterweise interagiert die Chromo-Domäne auch mit der kleinen 40S-UE. Dabei kontaktieren die Regionen, die die Chromo-Domäne N- und C-terminal mit ABC2 verbinden, die ribosomalen Proteine rpSX2 und rpS18. Das unbekannte rpSX2 ist oberhalb von rpS5 positioniert, von dem im molekularen Modell der kleinen 30S-UE der N-Terminus (Reste 1-75) fehlt. Möglicherweise stellt rpSX2 diesen fehlenden N-Terminus dar. Die Hauptkontakte zur kleinen UE werden allerdings von der HEAT-Domäne ausgeübt. Diese kontaktiert den Kopf der kleinen UE hauptsächlich mit den helixverbindenden Loops. Interaktionspartner auf ribosomaler Seite sind hier die Spitze von Helix 39 (*Repeats* 2-4), ein weiteres unbekanntes Protein, rpSX1 (*Repeats* 4 bis 6), das zwischen Helix 39 und Helix 41a liegt, und rpS18 (*Repeats* 6 und 7) (Abb.22).

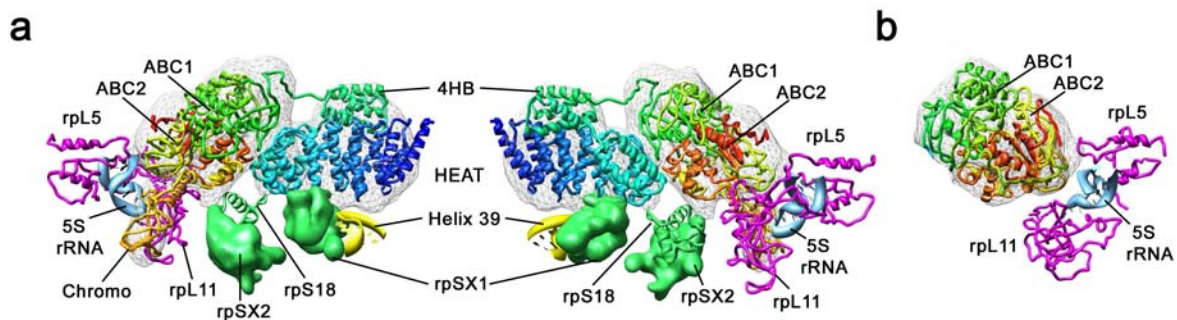


Abb. 22: a, Molekulare Kontakte von eEF3 mit ribosomalen Komponenten. Die Ansicht ist wie in Abb. 19a (links) und um 180° gedreht (rechts). Das Modell für eEF3-ATP ist wie in Abb. 19, das molekulare Modell für die ribosomalen Interaktionspartner wie in Abb. 20b dargestellt. b, wie a (rechts), nur nach oben gedreht. Hier soll die Interaktion der 5S-rRNA sowie der Proteine rpL5 und rpL11 der großen 60S-UE mit ABC2 und Chromo-Domäne von eEF3 hervorgehoben werden.

Natur des Kontaktes	Domäne von eEF3	Geschätzte Position	Ribosomale Untereinheit	Ribosomale Komponente	Geschätzte Position
p-R	HEAT	K58-K61	40S	16S-rRNA/ H39	U1362,U1363 (<i>S.c.</i>)
p-R	HEAT	G99-E104	40S	16S-rRNA/ H39	U1362,U1363 (<i>S.c.</i>)
p-R	HEAT	E138-W142	40S	16S-rRNA/ H39	C1358
p-R	HEAT	T139-Q143	40S	rpSX1	
p-R	HEAT	D180-E184	40S	rpSX1	
p-p	HEAT	A217-P223	40S	rpSX1	
p-p	HEAT	R252-E256	40S	rpSX1	
p-p	HEAT	A298-P303	40S	rpS18	H78-P82
p-p	ABC2	W757-E763	40S	rpSX2 (rpS5?)	
p-R	ABC2	G657-Q662	60S	5S-rRNA	U33-A34 (<i>H.m.</i>)
p-p	ABC2	G657-Q662 V666-V668 F688-C690	60S	rpL5	S205-D213
p-p	Chromo	R867-K872	40S	rpS18	T62-E67
p-R	Chromo	R803-N807	60S	5S-rRNA	C41-C42 (<i>H.m.</i>)
p-p	Chromo	R803-K806	60S	rpL11	G41-T43

Tab. 5: Kontakte zwischen eEF3 und dem Ribosom im eEF3-RNC-Komplex. Kontakte zwischen Protein und Protein sind mit p-p, Kontakte zwischen Protein und rRNA mit p-R gekennzeichnet. Die Bezeichnungen der Nukleotide beziehen sich auf rRNA-Modelle von *Haloarcula marismortui* (*H.m.*) im Falle der 5S-rRNA der großen 60S-UE und *Saccharomyces cerevisiae* im Falle der 18S-rRNA (Helix 39) der kleinen 40S-UE.

3.2.6 Modell für den ribosomengebundenen Zustand von eEF3 in der offenen Konformation

Aus der Kristallstruktur von eEF3 und den sich daraus ableitenden Modellen für den ADP- und ATP-gebundenen Zustand (vgl. Kap. 1.5.3, Abb. 8) sowie der Kryo-EM-Struktur konnte abgeleitet werden, dass eEF3 ein sehr dynamisches Molekül ist, bei dem die relative Orientierung der Domänen (ABC1, ABC2 und HEAT) flexibel zu sein scheint. Deshalb erschien es als sehr wahrscheinlich, dass diese Dynamik bei der Funktion von eEF3 im Elongationszyklus eine wichtige Rolle spielt. Mögliche Momente der dynamischen Reorientierung von Domänen sind bei der Bindung von Nukleotiden, bei der Bindung an das Ribosom und bei der Hydrolyse von ATP, auf die die Dissoziation des Faktors vom Ribosom folgt. Für ABC-Kassetten-Proteine ist bekannt, dass sich eine Konformationsänderung beim

Übergang vom offenen Dimer zum geschlossenen Dimer nach ATP-Bindung ereignet (Higgins and Linton 2004). Ein wichtiges Ergebnis der Bindungstests war, dass eEF3 zwar weniger affin, aber auch im ADP-Zustand oder in der apo-Form an RNCs bindet (Abb.16b). Möglicherweise gibt es einen initialen Bindungsschritt von eEF3 an das Ribosom, bei dem mit großer Wahrscheinlichkeit ein offener Dimer-Zustand vorliegt. Um die mögliche Dynamik von ribosomengebundenem eEF3 nachvollziehen zu können, wurde auf Basis des Modells für eEF3-ADP in Lösung ein Modell für die offene Konformation von eEF3 im ribosomengebundenen Zustand generiert. Da sowohl die HEAT-Domäne als auch die ABC-Domäne getrennt an das Ribosom binden können (Gontarek, Li et al. 1998; Kambampati, Pellegrino et al. 2000), wurde angenommen, dass beide auch in der offenen Form am initialen Kontakt mit dem Ribosom beteiligt sind. Daher wurde die ABC-Domäne des ADP-Modells von eEF3 in Lösung auf *Lobe1* von ABC2 (Reste 637-734 und Reste 915-976) im ribosomengebundenen Zustand aligniert, wobei der Kontakt von ABC2 zur 5S-rRNA und rpL5 erhalten blieb. Analog wurde die HEAT-Domäne in der Konformation aus der Kristallstruktur auf die ersten 5 *Repeats* (Reste 1-200) der ribosomengebundenen HEAT-Domäne, die Helix 39 und rpSX2 kontaktierten, aligniert.

Vergleicht man das erhaltende Modell für die offene Dimer-Form von eEF3 mit dem Modell für die geschlossene Dimer-Form, so beobachtet man eine konzertierte Bewegung von ABC1, der Chromo-Domäne, dem 4 Helix Bündel und den *Repeats* 6-8 (Abb.23a). Die Bewegung, betrachtet als Übergang von der offenen zur geschlossenen Form, ähnelt tatsächlich einer Art Klammerbewegung, bei der eEF3 quasi am Ribosom einrastet. Die Chromo-Domäne rotiert dabei insgesamt um 53° und bildet multiple Kontakte zu 60S- und 40S-UE aus. Der C-terminale Teil der HEAT-Domäne, das 4-Helix Bündel sowie ABC1 bewegen sich aufeinander zu. Interessanterweise sind die Positionen des 4-Helix Bündels und ABC1 im ADP-Modell so weit voneinander entfernt, dass diese nicht mehr miteinander verbunden werden können. Deshalb muss die initiale Bindung an das Ribosom einen Intermediärzustand zwischen der offenen und geschlossenen Form induzieren oder stabilisieren.

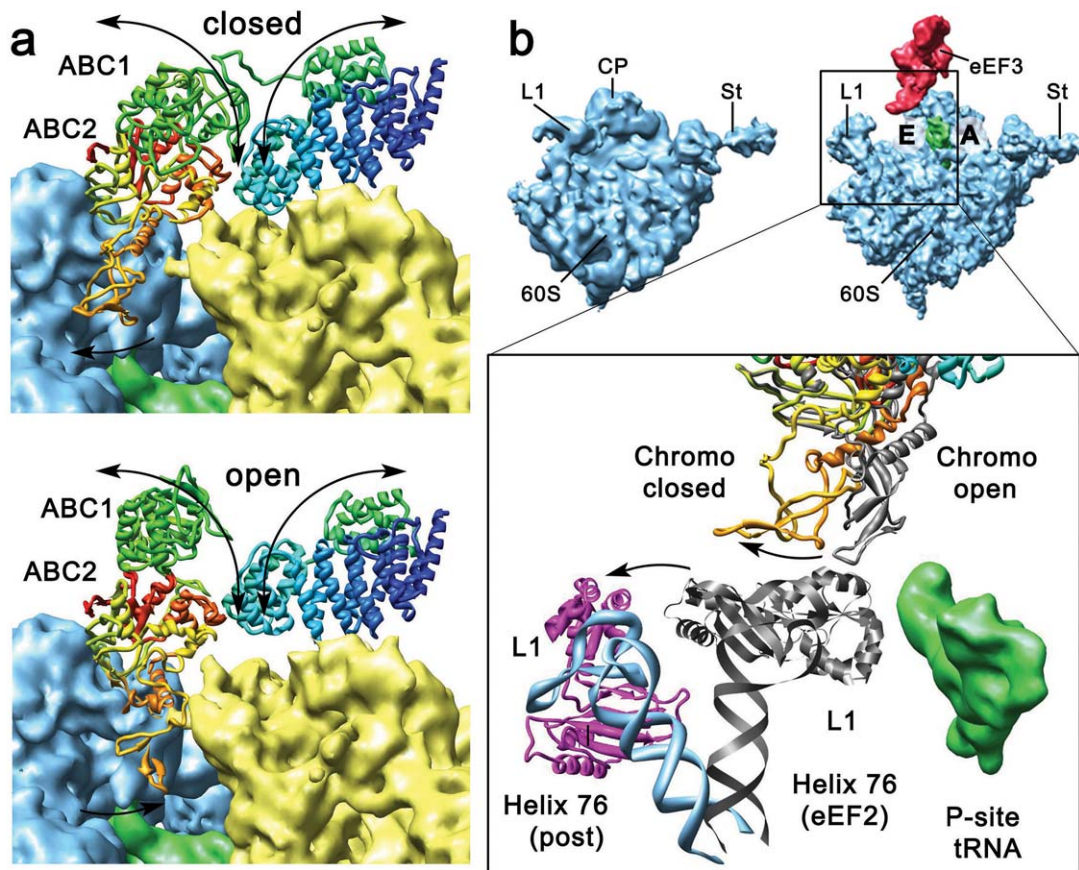


Abb. 23: Dynamisches Verhalten von eEF3. a, Molekulare Modelle für die beobachtete, geschlossene Form (ATP-Zustand, oben) und die angenäherte offene Form von ribosomengebundenem eEF3. Die Orientierung ist wie in Abb. 20c. Bewegungen von Domänen sind durch Pfeile angedeutet. ABC1, das 4-Helix-Bündel (dunkelgrün), die Helices H11-H16 (die drei C-terminalen HEAT-Repeats) und die Chromo-Domäne reorientieren sich beim Übergang zwischen der offenen und geschlossenen Konformation. b, oben: Position von eEF3 in Relation zur ribosomalen E- und A-Stelle (mit E und A bezeichnet) und zur dynamischen L1-Protuberanz in der *in*- und *out*-Position, wie sie beim 80S-eEF2-Sordarin-Komplex (links), bzw. beim RNC-eEF3-Komplex (rechts) beobachtet wurde. Unten: Bewegungen der Chromo-Domäne von eEF3 und des L1-Stalks der großen 60S-UE. Die durch den Kasten hervorgehobene Region ist hier vergrößert dargestellt und Elektronendichten durch molekulare Modelle ersetzt. Die tRNA in der P-Stelle ist grün, molekulare Modelle für die Chromo-Domäne von eEF3 in der offenen Konformation und den L1-Stalk in der *in*-Position grau, für eEF3 in der geschlossenen Konformation (ATP-Zustand) wie in Abb. 19 und L1 in der *out*-Position mit der rRNA-Helix 76 blau und dem L1-Protein magenta gezeigt. Die Richtung der Bewegungen von L1 vom eEF2-Zustand zum POST-Zustand sowie der Chromo-Domäne vom offenen zum geschlossenen Zustand ist durch Pfeile angezeigt.

3.2.7 Korrelation der Bewegung der Chromo-Domäne mit der Bewegung der L1-Protuberanz

Eine zentrale Frage ist es nun, welche Funktion eEF3 als dynamisches ABC-Protein am Ribosom ausübt, und ob diese Funktion mit der Rolle von eEF3 als E-Stellen-Faktor in Verbindung gebracht werden kann. Die Affinität der E-Stelle wird im Ribosom vermutlich auf zwei Wegen moduliert, nämlich durch den L1-*Stalk* und durch Bewegungen des Kopfes der kleinen 40S-UE.

Der L1-*Stalk*, auch L1-Protuberanz genannt, ist eine flexible Struktur in der Peripherie der großen 60S-UE, die aus dem L1-Protein und rRNA besteht. Der L1-*Stalk* wurde sowohl in Röntgenkristallstrukturen (Harms, Schlutzen et al. 2001; Yusupov, Yusupova et al. 2001) als auch in Kryo-EM-Rekonstruktionen in zwei unterschiedlichen Konformationen beobachtet. Befindet sich der L1-*Stalk* in der so genannten *in*-Konformation, ist die E-Stelle blockiert und E-Stellen-tRNA kann nicht aus der E-Stelle freigesetzt werden. Dies ist nur möglich, wenn L1 in der *out*-Position ist. Dazu rotiert der L1-Arm um 20-30° nach außen. Das Ausmaß dieser Bewegung ist von Organismus zu Organismus verschieden. In Kryo-EM-Rekonstruktionen wurde die äußere L1-Konformation (*out*-Konformation) bei Ribosomen in POST-Konformation beobachtet (Beckmann, Spahn et al. 2001). Bei Bindung von EF-G bzw. eEF2, also in der Konformation des Ribosoms während des RSR, bewegt sich der L1-*Stalk* nach innen (Gomez-Lorenzo, Spahn et al. 2000; Morgan, Menetret et al. 2002; Valle, Zavialov et al. 2003; Spahn, Gomez-Lorenzo et al. 2004). Die Bewegung des L1-Proteins erstreckt sich beim 70S-Ribosom auf ca. 20 Å, weitreichender ist sie jedoch beim Hefe-80S-Ribosom (50 Å), wo bislang die größten Unterschiede zwischen *in*-Konformation und *out*-Konformation beobachtet werden konnten (Gomez-Lorenzo, Spahn et al. 2000).

Die zweite Möglichkeit, die Eigenschaften der E-Stelle zu verändern, sind Konformationsänderungen im Kopf der kleinen 40S-UE (Yusupov, Yusupova et al. 2001; Morgan, Menetret et al. 2002; Ogle and Ramakrishnan 2004; Spahn, Gomez-Lorenzo et al. 2004). Aus Kristallstrukturen von kleinen 30S-UEs mit mRNA-Codons und Anticodonschleifen in der A-Stelle ist bekannt, dass die Genauigkeit bei der Codon-Anticodon-Wechselwirkung durch geringe Bewegungen an Kopf und Schulter (*shoulder*) verursacht wird. Durch solche subtilen Bewegungen des Kopfes, die bei der gegebenen Auflösung jedoch nicht zu sehen sind, könnte auch die reziproke Kopplung von A-Stelle und E-Stelle erklärt werden.

In diesem Zusammenhang ist die Position von eEF3 am Ribosom höchst interessant, da der Faktor mit der HEAT-Domäne genau auf dem Kopf der kleinen 40S-UE bindet und zusätzlich die Chromo-Domäne so positioniert ist, dass sie sich in unmittelbarer Nähe des L1-*Stalks* in *out*-Konformation befindet.

Deshalb wurde im Folgenden untersucht, ob ein funktionaler Zusammenhang zwischen der intrinsischen Dynamik von eEF3 und der Dynamik des L1-*Stalks* besteht. Um dies zu analysieren, wurden molekulare Modelle der L1-Protuberanz in der *in*-Konformation, wie sie in der 80S-eEF2-Sor-Struktur (vgl. Kap. 1.4, Abb. 6) beobachtet wurde und der *out*-Konformation, wie sie im eEF3-RNC- oder im RNC-Sec61-Komplex vorliegt, verglichen. Bei der Bewegung von der *in*- zur *out*-Position rotiert die L1-Protuberanz an der Scharnierregion in der rRNA um ca. 30°, was in einer Translationsbewegung des L1-Proteins von 50 Å resultiert. Interessanterweise folgt die Bewegung der Chromo-Domäne von der offenen zur geschlossenen Konformation am Ribosom der Bewegung des L1-*Stalks* (Abb. 23b). Die Chromo-Domäne rotiert in einer kombinierten Bewegung, die aus der Bindung ans Ribosom einerseits und durch den Übergang in den geschlossenen Dimer-Zustand andererseits resultiert, um ca. 53° an den beiden Glycinresten G762 und G864, was einer Translationsbewegung an der Spitze der Chromo-Domäne (Rest 822) von ca. 35 Å entspricht. Vergleicht man die Positionen der L1-*in*- mit der offenen Konformation von eEF3, kommt die Spitze der Chromo-Domäne sehr nahe dem L1-Protein gelegen. Dies legt nahe, dass die Chromo-Domäne möglicherweise aktiv daran beteiligt ist, L1 in die *out*-Konformation zu bringen. Zumindest erlaubt die Position der Chromo-Domäne in der eEF3-RNC-Struktur keine Bewegung des L1-*Stalks* zurück in die *in*-Position und stabilisiert demnach das Konformationsgleichgewicht in der *out*-Konformation.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass es möglich war, einen stabilen und funktionalen eEF3-RNC-Komplex in Anwesenheit von AMP-PNP und Neomycin zu formen und dessen Kryo-EM-Struktur zu lösen. Die Struktur zeigt eEF3 an einer bislang unbekannten ribosomalen Bindungsstelle. Durch Docken von Kristallstrukturen konnte diese Bindungsstelle auf molekularer Ebene beschrieben und charakterisiert werden. Darüber hinaus konnte ein funktionaler Zusammenhang zwischen dynamischen Bewegungen in eEF3 und auf Seiten des Ribosoms hergestellt werden, der die Rolle von eEF3 als Modulator der E-Stelle erklären könnte (s. Kap. 4.1.4).

3.3 Herstellung eines funktionalen RNC-Sec61-Komplexes

3.3.1 Präparation von Ribosomen mit naszierender Kette (RNCs) aus Hefe

Zunächst war das Ziel, die RNC-Präparation hinsichtlich Ausbeute und Qualität im Vergleich zur vorher beschriebenen Methode (Beckmann, Spahn et al. 2001) zu verbessern. Dort wurden RNCs nach IVT von trunkierter mRNA, die für eine Signalsequenz und einen HA-Tag codiert, an biotinylierte Anti-HA-Antikörper gebunden, und an streptavidin-gekoppelten magnetischen *Beads* immobilisiert. Nach Elution mit dem HA-Peptid konnten RNCs isoliert werden. Nachteile dieser Methode sind die relativ niedrige Ausbeute (ca. 6,25 pmol pro ml Translationsextrakt) und der anfällige Umgang mit den Antikörpern und den magnetischen *Beads*. Daher sollte das Protokoll auf ein konventionelles und wesentlich robusteres System mit poly-His-Tag und Metallaffinitätschromatographie umgestellt werden.

Mit dem Primer 5'-DP-His-HA wurde ein N-terminaler His-Tag in das DPAP-B-Substrat eingeführt. IVT von trunkierter His-HA-DP120-mRNA im Hefe-Translationsextrakt (YTE) resultierte nach SDS-PAGE und Western Blot in zwei Banden. Die höhere Bande repräsentiert das His-HA-DP120-Peptid, das noch an tRNA gebunden ist, die niedrigere das freie His-HA-DP120-Peptid. Nach der Translationsreaktion wurden die Ribosomen durch ein Hochsalz-Sukrosekissen (500 mM KOAc) pelletiert. Die ribosomale Fraktion enthält schätzungsweise 15-20% programmierte Ribosomen. Für die Affinitätsreinigung der RNCs auf Basis des His-Tags wurde TALONTM Metal Affinity Resin verwendet, das eine Matrix mit komplexierten Kobaltionen enthält. Nach Elution mit Imidazol konnten hoch angereicherte RNCs mit einer 3-4-fach größeren Ausbeute im Vergleich zur Reinigung über den HA-Tag bei sehr niedrigem Hintergrund durch unspezifisch gebundene Ribosomen (Daten nicht gezeigt) isoliert werden. In Abb. 24 ist die Reinigung der für Kryo-EM-Proben verwendeten DP120-RNCs dargestellt.

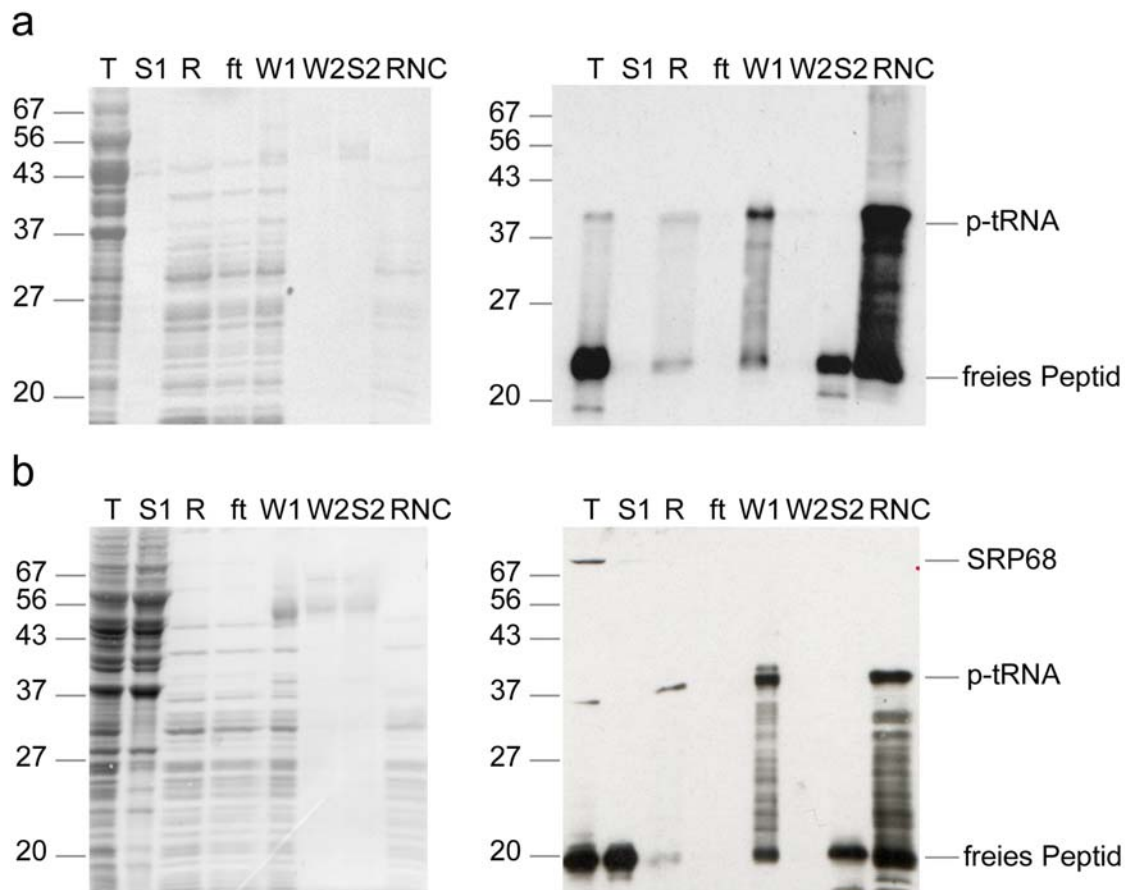


Abb. 24: Affinitätsreinigung von His-HA-DP120-RNCs. Eine trunkierte mRNA, die für die ersten 120 Aminosäuren der Dipeptidylaminopeptidase B mit N-terminalem His- und HA-Tags codiert, wurde in einem zellfreien Hefe-Translationssystem translatiert. RNCs wurden wie in Kap. 2.3.6 beschrieben gereinigt und Aliquots von Fraktionen durch SDS-PAGE und Western Blot unter Verwendung eines monoklonalen anti-HA-Antikörpers analysiert. Jeweils links sind die Nitrocellulose-Membranen nach Amidoschwarzfärbung, rechts die Filme nach ECL-Reaktion zu sehen. T, Translation (1/600); S1, Überstand (*supernatant*, oben 1/600, unten 1/120); R, ribosomales Pellet (1/600) nach der ersten Zentrifugation; ft, Durchfluss (*flowthrough*) nach der Inkubation mit dem Säulenmaterial (1/600); W1, W2, Waschfraktionen, (je 1/30); S2, Überstand; RNC, Pellet nach Elution mit Imidazol (je 1/30). Der Vergleich der Bandenintensität für die ribosomalen Proteine vor (R) und nach (RNC) der Reinigung mit der Signalintensität für freies Peptid und Peptidyl-tRNA (p-tRNA) auf dem Film zeigt die Anreicherung der RNCs. a, RNCs, die für die erste Kryo-EM-Probe verwendet wurden. Der Translationsextrakt wurde aus einem Hefestamm (Δ Ski7) gewonnen, bei dem das exosomale System, das trunkierte mRNA abbaut, ausgeschaltet ist. b, RNCs, die für die zweite und dritte Kryo-EM-Probe verwendet wurden. Der Translationsextrakt wurde aus einem Hefestamm mit genomisch getagtem SRP68-Protein gewonnen, der auch für die Kryo-EM-Struktur des RNC-Sec61-Komplexes von 2001 verwendet wurde.

3.3.2 Reinigung des trimeren Sec61-Komplexes aus Hefe und in *in vitro* Rekonstitution mit gereinigten DP120-RNCs

Der trimere Sec61-Komplex konnte wie in Kap 2.3.9 beschrieben gereinigt und durch SP Sepharose konzentriert werden (Abb. 25a). Eine nahezu stöchiometrisch vertretene Verunreinigung ist in einigen Präparationen eEF1A, das unspezifisch an Sepharose bindet. Aus 10 l Hefekultur konnten ca. 50 µg Sec61-Komplex gereinigt werden.

Zur *in vitro* Rekonstitution mit gereinigten DP120-RNCs wurde der trimere Sec61-Komplex in ca. 10-fachem molaren Überschuss mit RNCs inkubiert. Der Bindungstest erfolgte nach der Gefrierröhrchen-Technik. Aus Abb. 25b ist ersichtlich, dass Sec61 an RNCs bindet, wohingegen eEF1A nicht oder nur in sehr geringem Maße mit Ribosomen assoziiert und somit als interne Kontrolle dienen kann. Um zu testen, ob das naszierende Peptid inklusive Signalsequenz auch in den Kanal insertiert, wurde ein Proteaseprotektions-Experiment durchgeführt. Inkubiert man RNCs mit Proteinase K, so wird die naszierende Kette fast vollständig abgebaut. Man beobachtet eine tiefere Bande für ein fragmentiertes freies Peptid und das Signal für Peptidyl-tRNA verschwindet (Abb. 25c). Durch Zugabe von Sec61 wird die Aktivität der Proteinase K am naszierenden Peptid reduziert, woraus gefolgert werden kann, dass die naszierende Kette in den PCC insertiert und durch diesen vor der Protease geschützt ist. Somit lag ein geeignetes Präparat vor, um den PCC im aktiven Zustand mit korrekt insertierter Signalsequenz bei hoher Auflösung visualisieren zu können.

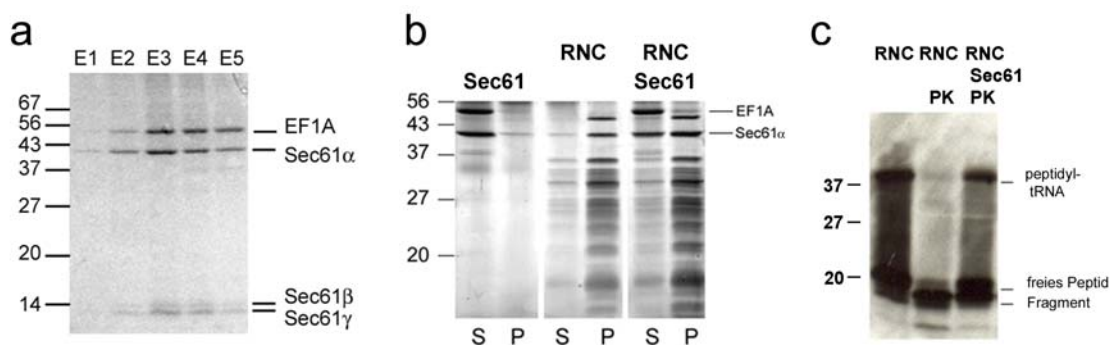


Abb. 25: Bindung von gereinigtem Sec61-Komplex an DP120-RNCs. a, SDS-PAGE und Coomassie-Färbung von Elutionsfraktionen (1/50) mit gereinigtem trimern Sec61 $\alpha\beta\gamma$ -Komplex nach Bindung an SP Sepharose. eEF1A wurde mit dem Komplex gereinigt. b, Bindung des Sec61-Komplexes an gereinigte DP120-RNCs. Komplexe aus gereinigten RNCs mit Sec61 im Überschuss wurden *in vitro* rekonstituiert und durch Dichtegradientenzentrifugation fraktioniert. Überstand- (S, supernatant) und Pelletfraktionen (P) wurden über SDS-PAGE und nachfolgender Färbung mit SYPRO® Orange analysiert. Sec61 bindet an RNCs, wohingegen eEF1A nur in sehr geringem Maße mit Ribosomen assoziiert. c, Proteaseprotektions-Experiment: RNCs und RNC-Sec61-Komplexe wurden mit Proteinase K für 30 min inkubiert und die Reaktion danach mit PMSF gestoppt. Die Ansätze wurden nach SDS-PAGE und Western Blot unter Verwendung eines monoklonalen anti-

HA-Antikörpers analysiert. Gezeigt ist der Film nach ECL-Reaktion. Die naszierende Kette wird durch den Sec61-Komplex vor der Protease geschützt.

3.4 Kryo-EM und 3D-Rekonstruktion des DP120-RNC-Sec61-Komplexes

Das Ziel der Kryo-EM und 3D-Rekonstruktion am DP120-RNC-Sec61-Komplex war es, diesen bei einer hinreichenden Auflösung zu visualisieren, um eine eindeutige molekulare Interpretation für den aktiven trimeren Sec61-Komplex im ribosomengebundenen Zustand zu ermöglichen. Dazu sollte eine Auflösung von 7-8 Å erreicht werden, die eine Visualisierung von α -helikalen Sekundärstrukturen erlaubt.

3.4.1 3D-Rekonstruktion von verschiedenen RNC-Sec61-Datensätzen

Die Daten für den DP120-RNC-Sec61-Komplex wurden in drei verschiedenen Messperioden am Tecnai F30-Mikroskop des Frank-Laboratoriums in Albany gesammelt (vgl. Kap. 2.5.8, Tab. 3). Die Verbesserung der Auflösung ist in Abb. 26 dokumentiert.

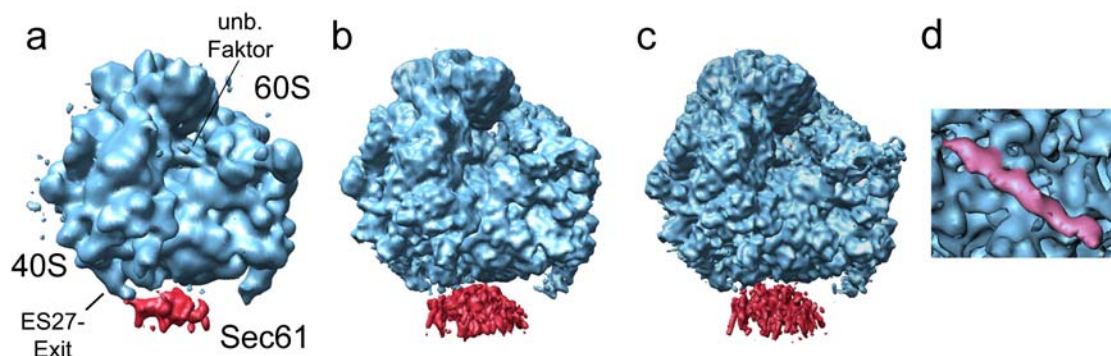


Abb. 26: Verbesserung der Auflösung des RNC-Sec61-Komplexes. a, 3D-Rekonstruktion des ersten (Δ Ski7-) Datensatzes bei 14,2 Å. Das Ribosom ist blau, Sec61 rot dargestellt. Man beachte das flexible Expansions-Segment ES27 in der Exit-Position und den unbekannten Faktor nahe der ribosomalen A-Stelle. b, 3D-Rekonstruktion des zweiten (SRP68-Xa-) Datensatzes bei 10,8 Å. Der unbekannte Faktor ist hier nicht zu sehen. c, 3D-Rekonstruktion nach Kombination der beiden Datensätze und gemeinsamen Refinement bei 9,9 Å. d, Bei einer Auflösung von 9,9 Å, lassen sich erstmals α -helikale Sekundärstrukturen auflösen (pink).

Mit dem ersten Datensatz (insgesamt 78000 Partikel) konnte eine Auflösung von 14,2 Å erreicht werden (Abb. 26a). Die 3D-Rekonstruktion nach Sortierung gegen leere 80S-Ribosomen zeigt die typische Erscheinung eines programmierten Hefe-80S-Ribosoms. Zusätzlich ist die Dichte von Sec61 an der Austrittsstelle für das naszierende Peptid (*Exit*-Stelle) an der 60S-UE zu sehen, die allerdings erst bei einem niedrigen Konturwerten

erscheint. Auffällig im Vergleich mit der RNC-Sec61-Konstruktion von 2001 ist die Präsenz einer zusätzlichen Dichte nahe der *Exit*-Stelle, die dem flexiblen RNA-Expansions-Segments ES27 zugeordnet werden kann. ES27 ist ein für 80S-Ribosomen charakteristisches, extrem flexibles rRNA-Segment (Gerbi 1996), das sich in einem Gleichgewicht zwischen zwei Extremkonformationen befindet (Beckmann, Spahn et al. 2001; Spahn, Beckmann et al. 2001) (Abb. 27). In der so genannten L1-Konformation befindet sich der 150 Å lange rRNA-Arm nahe des L1-*Stalks*. ES27 kann sich um 90° gegen den Uhrzeigersinn drehen und befindet sich dann in der so genannten *Exit*-Position. Dabei reicht die Spitze von ES27 zur ribosomalen *Exit*-Stelle. Demnach liegt im Datensatz des RNC-Sec61-Komplexes eine Mischpopulation aus RNCs mit gebundenem Sec61 und ES27 in der L1-Konformation sowie RNCs mit ES27 in der *Exit*-Konformation vor. Eine weitere, zusätzliche Dichte für einen bislang unbekannten Faktor wurde nahe der ribosomalen A-Stelle visualisiert (Abb. 26a). Dieser Faktor könnte aufgrund des Fehlens eines Abbau-Systems für *non-stop*-mRNA im Δ Ski7-Translationsextrakt an das translatierende Ribosom rekrutiert worden sein.

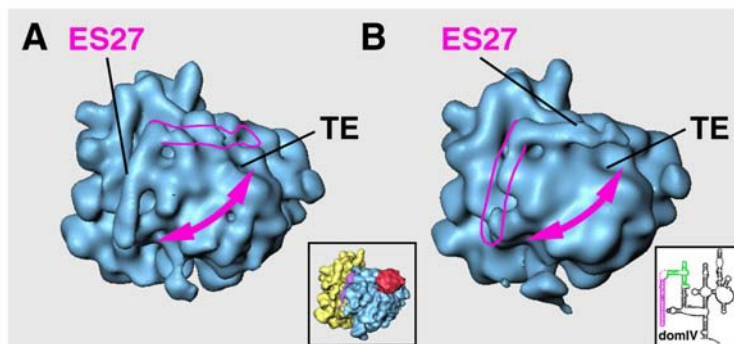


Abb. 27: Das dynamische Expansions-Segment ES27. a, 3D- Rekonstruktion eines Ribosom-Sec61-Komplexes in Triton X-100 (Beckmann, Bubeck et al. 1997), gezeigt ohne Dichte für den Kanal. TE bezeichnet den Tunnelausgang, L1 die L1 Protuberanz. Das Expansionssegment 27 (ES27) befindet sich hier in L1-Position. Die pinkfarbene Kontur zeigt die Exit-Position von ES27 an, wie sie in b beobachtet wurde. Rechts unten ist die 15,4 Å Rekonstruktion in der gleichen Orientierung wie in den Strukturen in a und b zu sehen. b, 3D-Rekonstruktion des inaktiven Ribosoms ohne gebundenes Sec61 bei 24,8 Å. ES27 befindet sich in Exit-Position, wobei die sich Spitze nahe dem Exit-Tunnel befindet. Die pinkfarbene Kontur zeigt die Exit-Position von ES27 wie in a zu sehen. Rechts ist das Sekundärstrukturdiagramm von Domäne IV der 25S-rRNA aus *S. cerevisiae* zu sehen, wobei ES27 grün und die bewegliche Helix pink gezeigt wurde (<http://www.rna.icmb.utexas.edu>) (Beckmann, Spahn et al. 2001).

Auf Basis der Erkenntnisse aus dem ersten Datensatz wurden für die folgenden RNC-Sec61-Datensätze nachfolgende Punkte verbessert. Da die Möglichkeit bestand, dass der unbekannte Faktor die Auflösung der Komplexes limitiert, indem er Konformationsänderungen im

Ribosom induziert, wurde ein Translationsextrakt aus dem Stamm SRP68prA, um der schon für die RNC-Präparation von 2001 verwendet wurde, hergestellt, um RNCs zu reinigen. Zudem wurde eine neue Sec61-Präparation verwendet, bei der der trimere Komplex konzentrierter als bei der ersten Probe war. Dies ermöglichte die Zugabe einer größeren Menge an Sec61 bei der *in vitro* Rekonstitution, womit eine höhere Besetzung der RNCs mit Sec61 erreicht werden sollte.

Mit dem zweiten Datensatz (insgesamt 67000 Partikel) konnte nach Sortierung gegen leere Ribosomen eine Auflösung von 10,8 Å erreicht werden (Abb. 26b). In der 3D-Rekonstruktion fehlt der unbekannte Faktor. ES27 ist jedoch immer noch zu einem großen Anteil in *Exit*-Position und verzerrt die Dichte für Sec61. Mit dieser Rekonstruktion als Referenz wurde der erste Datensatz nun noch einmal komplett neu aligniert. Beide Datensätze wurden vereinigt (insgesamt 112000 Partikel, die programmierten Ribosomen entsprechen) und gemeinsam der Refinementprozedur unterworfen. Die resultierende 3D-Rekonstruktion erreichte nun eine Auflösung von 9,9 Å. Hier konnten α -helikale Sekundärstrukturen für ribosomale Proteine aufgelöst werden (Abb. 26c, 26d).

Eine Interpretation der Dichte für Sec61 auf molekularer Ebene war jedoch nicht möglich, da diese zuviel Rauschen enthielt und von der Dichte des ES27 überlagert war. Deshalb wurde eine Sortierung hinsichtlich der Präsenz von Sec61 an der *Exit*-Stelle vorgenommen. Dazu wurde das RNC-Sec61-Volumen mit einer binären Maske nur das programmierte 80S-Ribosom einschließend multipliziert. Das daraus resultierende Volumen ohne Sec61 und das unmaskierte mit Sec61 wurden dann parallel als Referenzen für die Sortierung angeboten. Das Resultat war jedoch nur bedingt befriedigend, da sich viele Partikel mit ES27 in der *Exit*-Position nicht von der Sec61-enhaltenden Subpopulation trennen ließen (Daten nicht gezeigt).

Um die Auflösung des Gesamtkomplexes weiter zu verbessern, wurden nun weitere Daten gesammelt (dritter Datensatz, insgesamt 190000 Partikel) und nach Sortierung gegen leere Ribosomen und nach einigen Runden Refinement mit den beiden ersten Datensätzen vereinigt (insgesamt 246000 Partikel).

3.4.2 Sortierung des gesamten RNC-Sec61-Datensatzes

Parallel zur Auflösungsverbesserung des gesamten Datensatzes sollte eine Sortierungs-Strategie entwickelt werden, die eine effiziente Trennung der ES27-Konformationen erzielt, um anschließend einen Unterdatensatz zu generieren, worin nur noch Sec61 an der *Exit*-Stelle präsent ist.

Die 3D-Rekonstruktion des Hefe-80S-Ribosoms im Komplex mit dem IRES-Element aus dem Cricket-Paralysis-Virus (CPV-IRES-80S-Komplex) (Schüler, Spahn et al., unpublizierte Daten) zeigt ES27 fast komplett in der *Exit*-Position. Deshalb wurde diese als initiale ES27-Exit-Referenz verwendet. Zur Erstellung einer Referenz für ES27 in L1-Position wurde ES27 in *Exit*-Position maskiert, wobei der Bereich, der von Sec61 eingenommen wird, ausgespart wurde. Das Resultat der Sortierung ist in Abb. 28 und Abb. 29 zu sehen.

In der zweiten Runde der Sortierung wurden 15% der Partikel zur ES27-Exit-Referenz sortiert. Diese Partikel zeigen tatsächlich ES27 in *Exit*-Position und kein ES27 in L1-Position. Im Gegenvolumen ist jedoch weiterhin ES27 in *Exit*-Position sichtbar. Nach der sechsten Runde der Sortierung wurden 38% aller Partikel (ES27-Exit-Volumen) zur ES27-Exit-Referenz sortiert. Bei vergleichbaren Konturwerten ist die Dichte von ES27 in *Exit*-Position gegenüber der zweiten Runde viel stärker geworden und man sieht eine Dichte an der *Exit*-Stelle nahe des *Exit*-Tunnel, die nicht Sec61 entspricht und keine Verbindungen zum Ribosom zeigt. Im Gegenvolumen (ES27-L1-Volumen) ist die Dichte für ES27 in der L1-Position im Vergleich zur zweiten Sortierungsrunde stärker, die Dichte von ES27 in *Exit*-Position ist jedoch nur noch bei sehr niedrigem Konturwerten zu sehen. Gleichzeitig ist die Dichte von Sec61 kleiner, aber auch und definierter geworden.

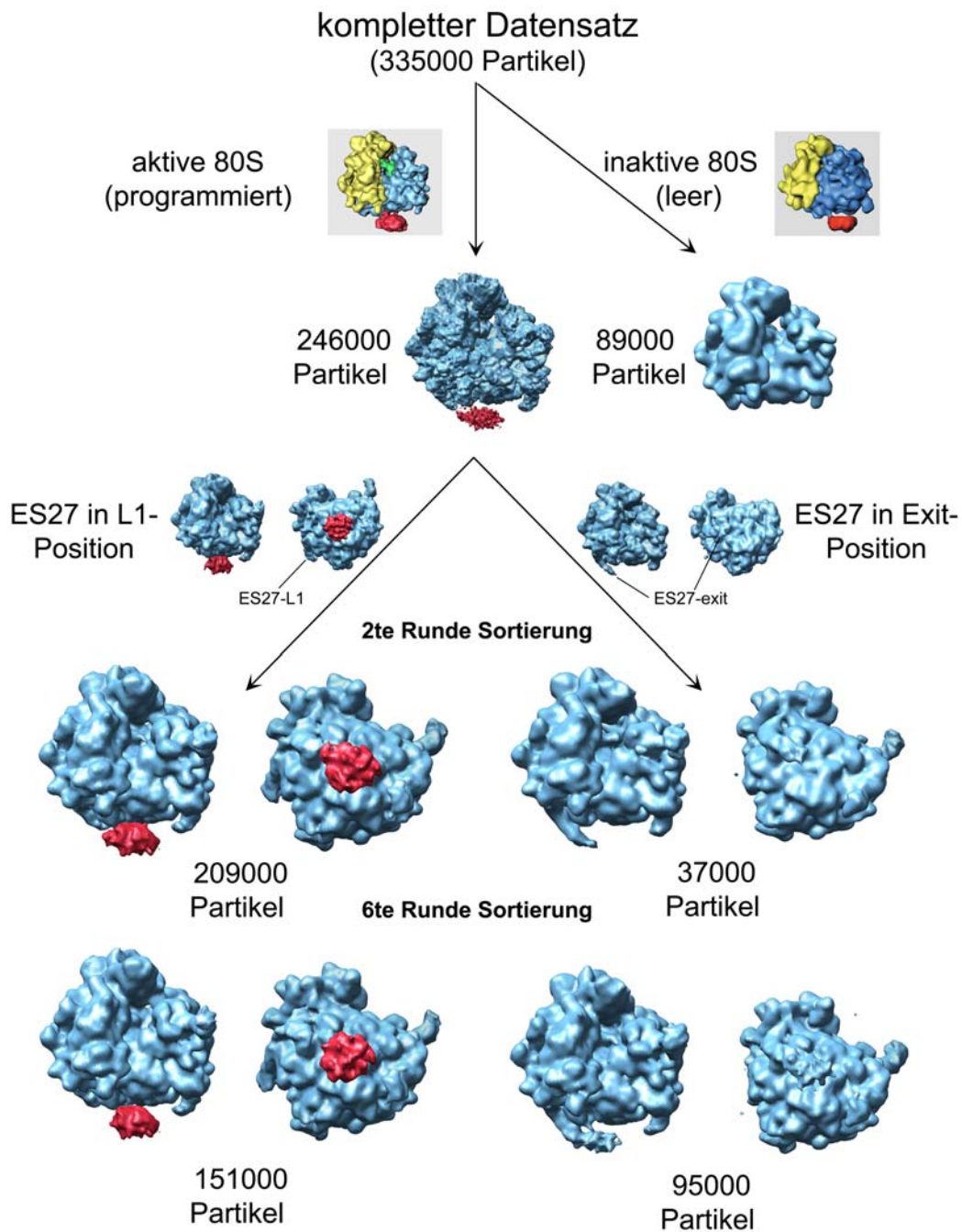


Abb. 28: Schema 1 für die Sortierung des RNC-Sec61-Datensatzes. Der komplette Datensatz wurde zunächst gegen leere Ribosomen sortiert. Als Referenzen dienten die 3D-Rekonstruktionen für den RNC-Sec61-Komplex und den 80S-Sec61-Komplex von 2001 (Beckmann, Spahn et al. 2001). 89000 (26,5%) aller Partikel wurden hier zum leeren Ribosom sortiert. Die restlichen Partikel (246000; programmierte Ribosomen) wurden hinsichtlich der ES27-Konformation sortiert. Als ES27-Exit-Referenz diente die 3D-Rekonstruktion des CPV-IRES-Hefe-80S-Komplexes (Spahn), als ES27-L1-Referenz diente die 3D-Rekonstruktion des RNC-Sec61-Komplexes aller programmierten Partikel, wobei ES27 in der Exit-Position maskiert wurde. Nach 6 Runden der Sortierung wurde der Datensatz geteilt in 151000 Partikel (62%), die Sec61 und ES27 in L1-Position enthielten und 95000 (38%) Partikel, die kein Sec61 und ES27 in Exit-Position enthielten. Sortierungen wurden wie in Kap. 2.5.7 beschrieben durchgeführt.

Der sortierte Datensatz mit den Partikeln, die Sec61 an der *Exit*-Stelle und ES27 in der L1-Position hatten (151000 Partikel), wurde nun auf die Präsenz von Sec61 weiter sortiert (Abb.5). Diesmal konnte der Datensatz sofort erfolgreich in zwei Sub-Datensätze unterteilt werden, von denen ein Teil (ES27-L1-Sec61-Volumen, 92000 Partikel) Sec61 an der *Exit*-Stelle zeigt, der andere (ES27-L1- Δ Sec61) jedoch kein Sec61 enthält. Dafür ist dort um die Sec61-Position herum fragmentierte Dichte zu sehen, die möglicherweise von delokalisiertem ES27 stammt. In beiden Volumina ist jedoch ES27 zum größten Teil in der L1-Position.

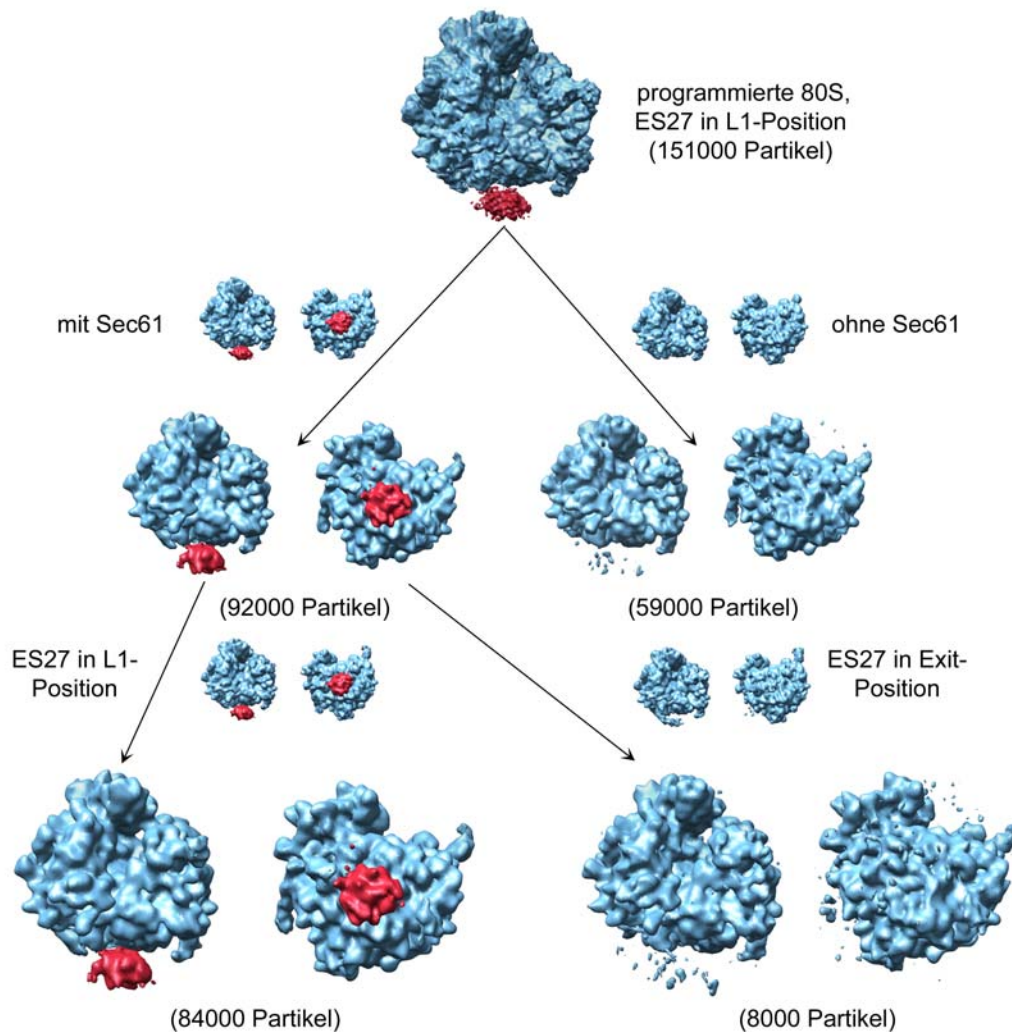


Abb. 29: Schema 2 für die Sortierung des RNC-Sec61-Datensatzes. Alle Partikel, die programmierten Ribosomen entsprachen und ES27 in L1-Position hatten, wurden iterativ auf die Präsenz von Sec61 hin sortiert. Als initiale Referenzen dienten die Ausgangsvolumina (ES27-L1-Volumen) mit und ohne Sec61. Der Datensatz wurde hierbei geteilt in 92000 Partikel (61%), die Sec61 enthielten und 59000 (39%) Partikel, die kein Sec61 enthielten. Dafür sieht man Rauschen um die Position von Sec61 herum. Um restliches ES27 in Exit-Position zu entfernen, wurde das ES27-L1-Sec61-Volumen noch einmal gegen das ES27-Exit-Volumen sortiert. Dadurch konnten weitere 8000 Partikel (8,7%) aussortiert werden, die kein Sec61 gebunden haben.

Die Selektionsdateien aus den Sortierungen wurden nun zur Rückprojektion bei einer Pixelgröße von 2 Å und den Euler'schen Winkeln aus der finalen Rekonstruktion aller programmierten Partikel verwendet. Um die Qualität der Sortierungen zu vergleichen, wurden das Ausgangsvolumen (alle programmierten Ribosomen) und die resultierenden Untervolumina (ES27-Exit-Volumen, ES27-L1-Volumen und ES27-L1-Sec61-Volumen) gemeinsam dargestellt (Abb. 30).

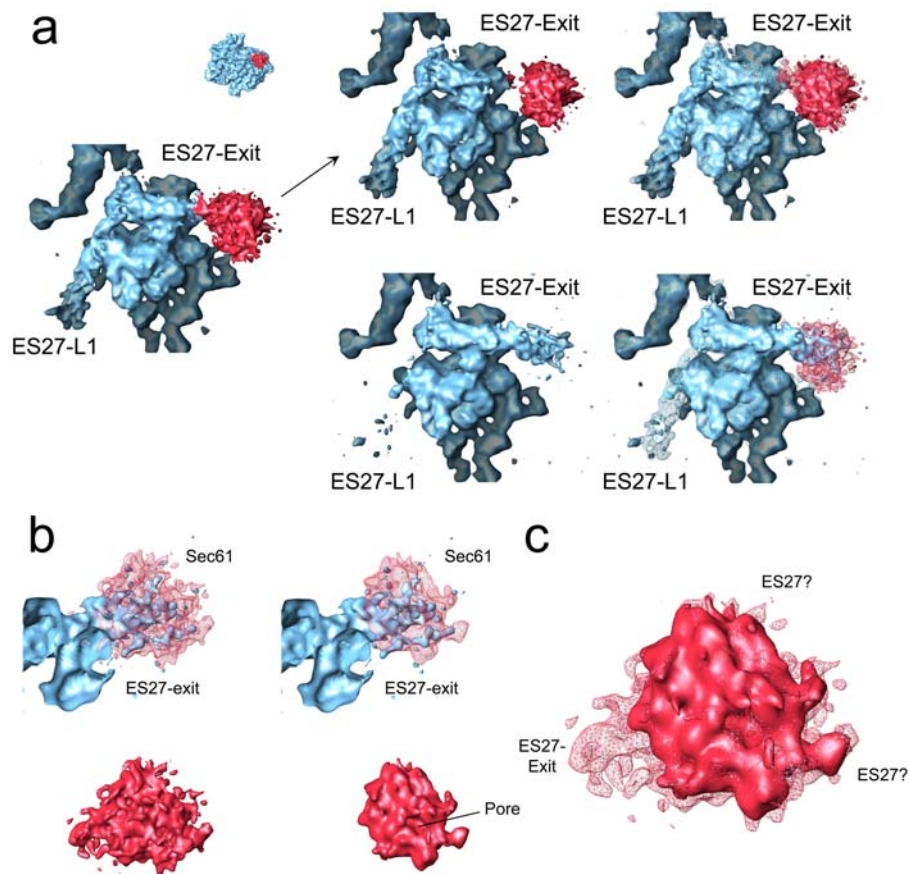


Abb. 30: Beurteilung der Sortierung nach ES27-Konformation und Sec61-Besetzung. a, Das Ausgangsvolumen der Sortierung (alle programmierten Ribosomen, 246000 Partikel, links) sowie die Endvolumina nach der ES27-Sortierung (ES27-L1-Volumen, Mitte oben; ES27-Exit-Volumen, Mitte unten) sind nach Rückprojektion mit den entsprechenden Selektionsdateien bei einer Pixelgröße von 2 Å und den Euler'schen Winkeln aus dem Refinement aller programmierten Ribosomen mit Blick auf ES27 dargestellt. Die 60-UE ist blau, Sec61 rot gezeigt. Rechts wurde das Ausgangsvolumen als transparenter Maschendraht dargestellt und über die jeweiligen Endvolumina gelegt. Deutlich ist zu sehen, dass ES27 hinsichtlich seiner Konformation sortiert werden konnte und dass kein Sec61 gebunden ist, wenn sich ES27 in der Exit-Position befindet. b, ES27 in Exit-Position (blau), und isoliertes Sec61 (rot) aus dem Ausgangsvolumen (links) bzw. dem Endvolumen nach ES27-Sortierung und Sec61-Sortierung (ES27-L1-Sec61-Volumen, rechts) sind mit Blick von oben übereinander gelegt (oben). Sec61 ist hierbei als transparenter Maschendraht dargestellt. Unten ist Sec61 in Oberflächenrepräsentation gezeigt. c, Vergrößerte Darstellung des isolierten Sec61 vor (transparenter Maschendraht) und nach der Sortierung. Man beachte, dass offensichtlich auch nach der Sortierung noch Dichte für ES27 in der Exit-Position befindet, die mit der Sec61-Dichte interferiert.

Beim Vergleich des Ausgangsvolumens für die ES27-Sortierung mit den resultierenden Volumina aus den Unterdatensätzen (ES27-Exit-Volumen und ES27-L1-Volumen) wird deutlich, dass ES27 erfolgreich hinsichtlich seiner Konformation sortiert werden konnte (Abb. 30a). ES27 ist nach der Sortierung fast vollständig entweder in *Exit*-Position oder in L1-Position. Beim Vergleich der isolierten Dichten für den Sec61-Komplex zwischen dem Ausgangsvolumen bzw. dem ES27-L1-Sec61-Volumen stellt man fest, dass der Kanal nach der Sortierung eine definiertere Kontur und ein besseres Signal-Rauschverhältnis zeigt (Abb. 30b, 30c). Als auffälligstes Merkmal kann von oben betrachtet eine Einkerbung beobachtet werden, die im Weiteren als Pore bezeichnet wird. Vergleicht man das ES27-Exit-Volumen mit den beiden Kanaldichten, wird jedoch offenbar, dass noch ES27 in *Exit*-Konformation vorhanden sein könnte. Deshalb wurde nach der Sortierung auf Präsenz von Sec61 eine weitere Sortierung hinsichtlich ES27-Konformation durchgeführt (Abb. 29, unten). Als Referenzen dienten das ES27-L1-Sec61-Volumen und das ES27-Exit-Volumen. Dadurch konnten zwar weitere 8000 Partikel, die kein Sec61 besitzen, aussortiert werden. Dennoch war die Sortierung vermutlich nicht vollständig.

Für das weitere Refinement der Struktur wurde nun nur noch der Unterdatensatz verwendet, der programmierte Ribosomen mit ES27 in L1-Position repräsentiert (151000 Partikel). Die Auflösung konnte für diesen Datensatz bislang auf 9,5 Å verbessert werden. Für die letzte Rückprojektion wurde nur der Unterdatensatz mit Partikeln, die auch Sec61 zeigen (84000 Partikel) verwendet. Beim bp rp-Algorithmus wurde hier ein Wichtungsfaktor auf Basis der Korrelationskoeffizienten der einzelnen Partikel mit der Referenz durchgeführt. Dieser Schritt kann in einigen Fällen das Signal-Rauschverhältnis von Liganden erhöhen. Ein Überblick über diese finale Rekonstruktion bei 12,3 Å (Abb. 31) ist in Abb. 32a gezeigt.

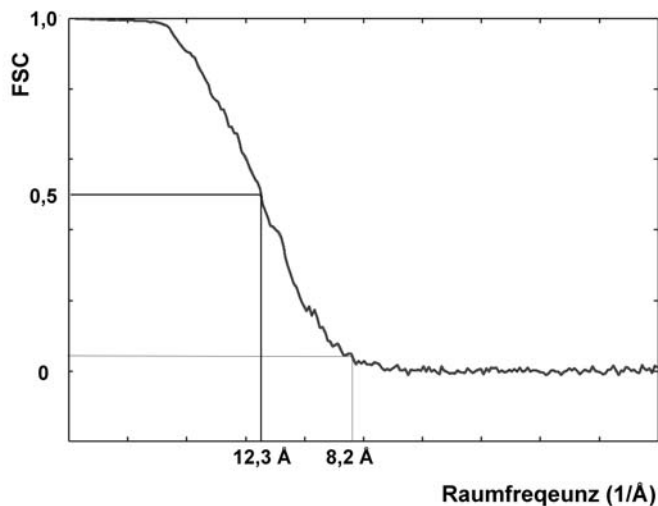


Abb. 31: Auflösungskurve für die 3D-Rekonstruktion des RNC-Sec61-Komplexes (84000 Partikel). Bei einer Fourier-Shell-Korrelation (FSC) von 0,5 beträgt die Auflösung 12,3 Å, gemäß dem 3 σ -Kriterium 8,2 Å.

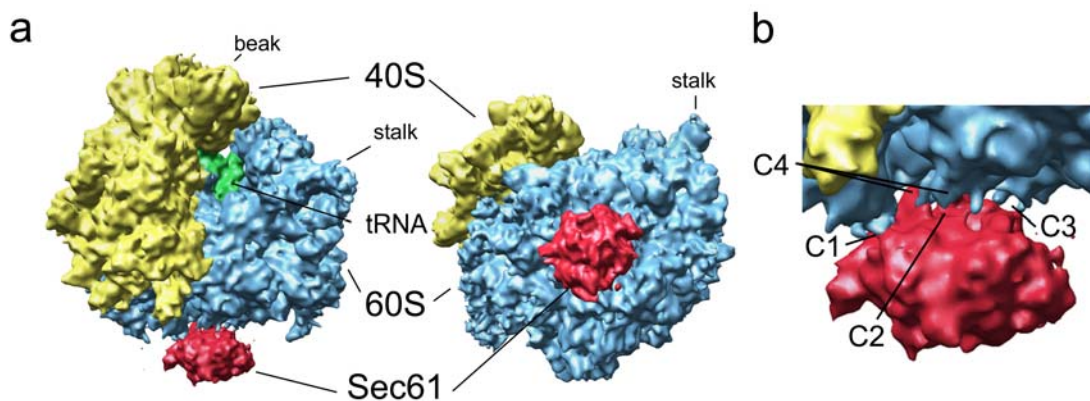


Abb. 32: Kryo-EM-Rekonstruktion des DP120-RNC-Sec61-Komplexes aus Hefe nach Sortierung. a, Seitenansicht (links) und Ansicht von unten (rechts); Die kleine 40S-UE ist gelb, die große 60S-UE blau, tRNA in der P-Stelle grün und der Sec61-Komplex rot gezeigt. Charakteristische Merkmale für 60S- und 40S-UE sind angezeigt. b, Ausschnitt aus a mit Blick auf die Verbindungen zwischen 60S-UE und dem Sec61-Komplex. Die Verbindungen sind analog der Rekonstruktion des RNC-Sec61-Komplexes von 2001 mit C1-C4 bezeichnet (vgl. Kap. 1.8.4, Abb. 10).

Die Elektronendichte zeigt die bereits aus der 3D-Rekonstruktion des RNC-Sec61-Komplexes von 2001 bekannten Verbindungen zum Ribosom (Beckmann, Spahn et al. 2001) (Abb. 32b). C1 stellt die Verbindung zu Helix 59 der 25S-rRNA dar. Für C2, die Verbindung zu Helix 53 und Helix 50 sowie rpL25 und rpL19 sind hier in mindestens zwei Verbindungen zu unterscheiden. Dasselbe gilt für C3, die Verbindung zu Helix 24 sowie rpL26. Verbindung C4, zur Helix 7 sowie den Proteinen rpL25 und rpL35 zeigt die stärksten Verbindungen zum Ribosom und spaltet sich in mehrere Kontakte auf.

3.4.3 Struktur der isolierten Sec61-Elektronendichte

Die isolierte Dichte für Sec61 (Abb. 33) hat eine, konvexe, ellipsoide Form mit einem Durchmesser von 80-90 Å und einer Höhe von 35-45 Å und ist damit vergleichbar mit der Rekonstruktion von 2001. Ein charakteristisches Merkmal des Kanals ist von oben betrachtet eine Pore von ca. 5-10 Å Durchmesser. Diese Pore liegt direkt unterhalb des Peptid-*Exit*-Tunnels. Möglicherweise handelt es sich bei der Pore um die trichterförmige Öffnung, die im Modell für den aktiven Zustand des SecYE β -Komplexes aus *M. jannaschii* gezeigt wurde (Kap. 1.8.5, Abb. 12). Eine Sanduhr-Form mit einer Verjüngung in der Mitte kann für den aktiven Hefe-Sec61-Komplex bei der gegebenen Auflösung jedoch nicht gezeigt werden. Von unten gesehen ist der Kanal geschlossen, jedoch zeigt sich an der entsprechenden Stelle auch hier eine Einkerbung.

Betrachtet man die Kanaldichte bei unterschiedlichen Konturwerten, erkennt man, dass die Dichte um die Pore herum die kompakteste Erscheinung hat. Die peripheren Bereiche, die eventuell restliches ES27 in *Exit*-Konformation oder die die hydrophoben Bereiche umgebende Mizelle repräsentieren, erscheinen erst bei relativ niedrigem Konturwerten.

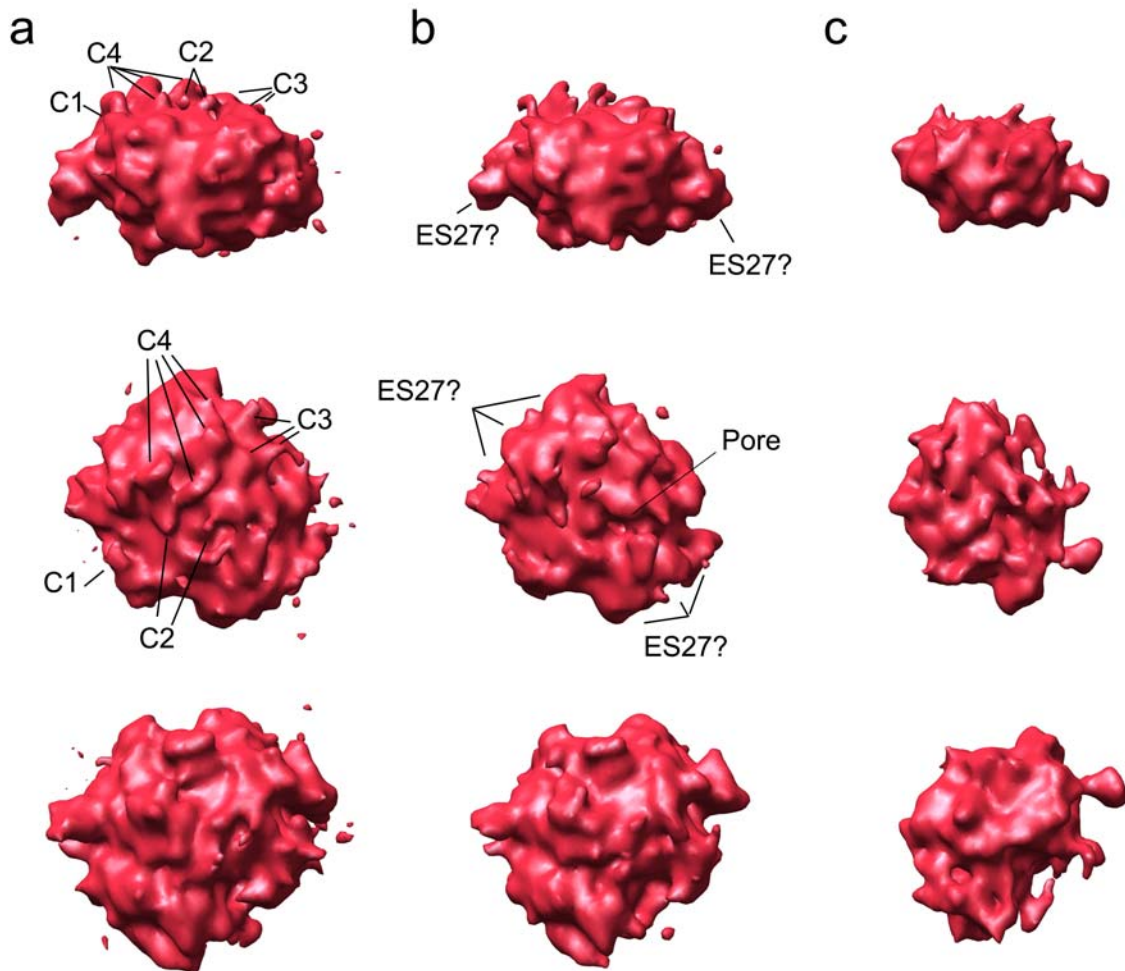


Abb. 33: Isolierte Dichte für den aktiven, ribosomengebundenen Sec61-Komplex bei unterschiedlichen Konturwerten. Die Dichte ist von der Seite (oben) wie in Abb. 32a, sowie von oben und von unten gezeigt, wobei die Ansichten um 90° in Richtung (Mitte) oder entgegen der Richtung (unten) des Betrachters gedreht sind. Der Konturwert wurde von a nach c erhöht. Die Verbindungen C1-C4 sowie die Pore bei der Aufsicht auf den Kanal und eventuelle Reste von Dichte, die ES27 in der Exit-Konformation repräsentiert, sind angezeigt.

3.4.4 Docking von molekularen Modellen in die Kryo-EM-Dichte für Sec61

Da die lokale Auflösung der Dichte für den trimeren Sec61-Komplex nicht hinreichend war, um α -helikale Sekundärstruktur zu visualisieren, war eine eindeutige Interpretation auf molekularer Ebene bislang nicht möglich. Jedoch war die Qualität der Dichte ausreichend, um den oligomeren Zustand des Sec61-Komplexes mit Hilfe der bereits bekannten Modelle abschätzen zu können.

Selbst bei sehr niedrigen Konturwerten war die Elektronendichte für Sec61 zu klein, um mehr als zwei trimere SecYE β -Komplexe aus *M. jannaschii* (PDB 1RHZ) (Van den Berg, Clemons et al. 2004) einpassen zu können. Deshalb kann ein trimerer oder tetramerer Zustand ausgeschlossen werden. Daraufhin wurden die Modelle für das geöffnete *front-to-front*-Dimer

(Mitra, Schaffitzel et al. 2005) oder das geschlossene *back-to-back*-Dimer in die korrespondierende Elektronendichte gedockt. Zudem wurde ein Modell für den aktiven, monomeren Zustand generiert, indem die Reste des *Plugs* von SecY entfernt und das Molekül gemäß dem vorgeschlagenen Modell an der Scharnier-Region (*Hinge*-Region, zwischen TM5 und TM6) geöffnet wurde.

Als erste Orientierung für das Docken wurde versucht, die Modelle so zu platzieren, dass die Pore mit der visualisierten Pore zusammenfällt. Dann wurde überprüft, ob die Verbindungen zum Ribosom gedockt werden können. Insbesondere wurde versucht, die zytosolischen Loops, die als primäre Interaktionspartner mit dem Ribosom beschrieben wurden, in die Elektronendichte einzupassen. Zusätzlich wurde in Betracht gezogen, dass eventuell noch Dichte von ES27 in der *Exit*-Position und Dichte der Mizelle um den Kanal herum sichtbar ist.

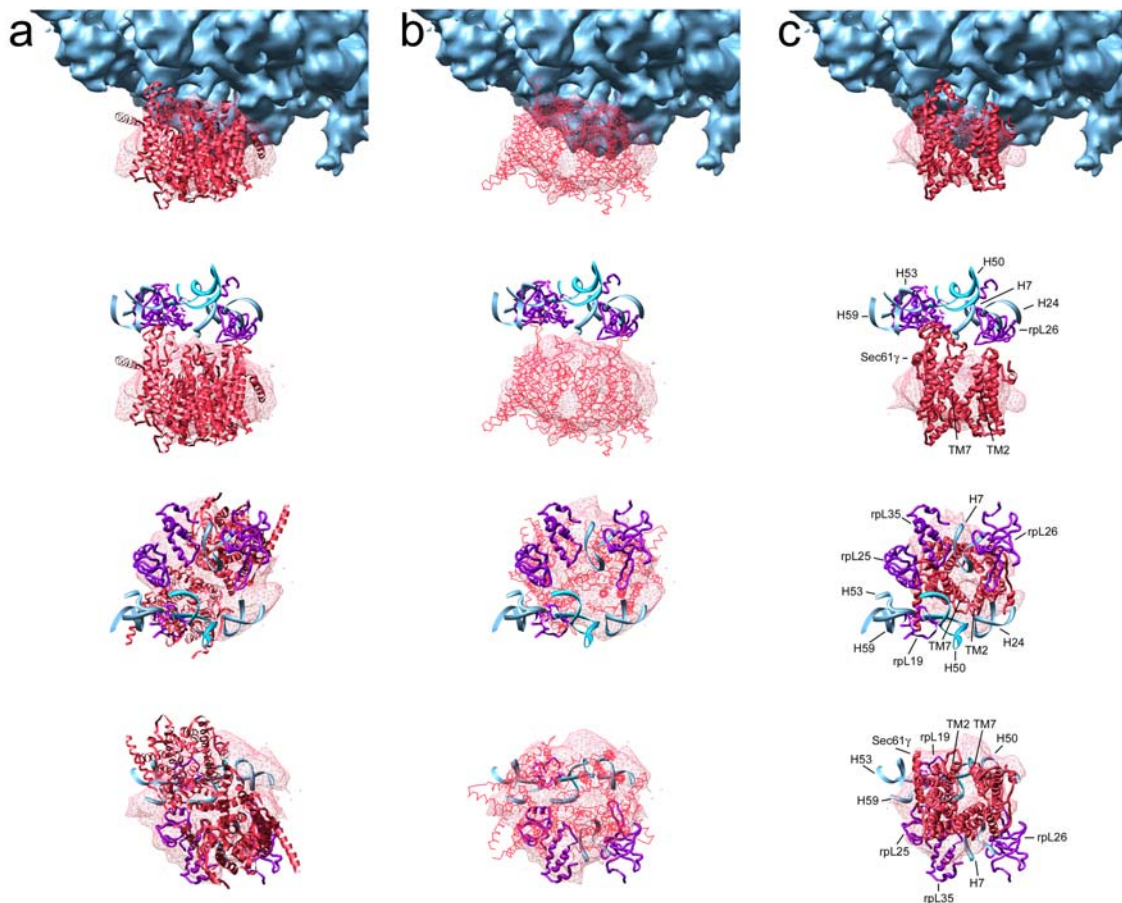


Abb. 34: Docking von Modellen für den oligomeren Zustand des aktiven Sec61-Komplexes in die isolierte Kryo-EM-Dichte. Es wurden Modelle für ein Dimer in back-to-back-Anordnung (Breyton, Haase et al. 2002) (a), geöffneter front-to-front-Anordnung (Mitra, Schaffitzel et al. 2005). (b) und ein geöffnetes Monomer (c) gedockt. Die Dichte für den Sec61-Komplex ist als transparenter Maschendraht dargestellt. In der obersten Reihe ist die Seitenansicht des Kanals mit der Dichte für die 60S-UE (blau) gezeigt. Darunter ist die Seitenansicht (zweite Reihe) sowie die Ansichten von oben (dritte Reihe) und von unten (vierte Reihe) zusammen mit molekularen Modellen für den Bereich um den Peptid-Exit-Tunnel der 60S-UE (Spahn, Beckmann et al. 2001) gezeigt. Modelle für die rRNA-Helices 7, 24, 50, 53 und 59 sind blau, Modelle für die Proteine rpL19, rpL25, rpL26 und rpL35 violett gezeigt. Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurden die Proteine rpL19 sowie die rRNA-Helices auf die Interaktionsbereiche mit Sec61 trunkiert.

Von den Möglichkeiten für die molekulare Anordnung eines Sec61-Dimers erscheint die geöffnete *front-to-front*-Anordnung wahrscheinlicher als die *back-to-back*-Anordnung. Selbst wenn man in letzterer Anordnung ein einzelnes Monomer verschiebt, ist kein Docking möglich, das die Elektronendichte ausfüllt und die vermutlichen Poren von Modell und EM-Dichte miteinander korreliert (Abb. 34a). Im gezeigten Modell wurden die zytosolischen Loops von Sec61 α in die Verbindungen nahe H59 und bzw. H24 der 25S-rRNA gedockt. Die Pore aus der EM-Dichte befindet sich hier nahe der Kontaktstelle der beiden Monomere im Modell.

Das offene *front-to-front*-Dimer (Abb. 34b) zeigt eine bessere Korrelation mit der Dichte und füllt diese bei niedrigen Konturwerten fast komplett aus. Allerdings kann die beobachtete Pore auch durch diesen Fit nicht erklärt werden. Des Weiteren befinden sich einige TM-Helices klar außerhalb der Dichte. Jedoch ist die Auflösung nicht gut genug, um die Richtigkeit des *front-to-front*-Modells im Vergleich zum aktiven Monomer zu widerlegen oder zu bestätigen.

Am Besten lässt sich ein geöffnetes Sec61-Monomer in die Kryo-EM-Dichte docken (Abb. 34c). Korreliert man die Pore des Modells mit EM-Dichte, so passt diese exakt in die Kerndichte für den aktiven Sec61-Komplex, die auch bei hohen Konturwerten noch sichtbar ist. Für die Orientierung des Monomers gibt es jedoch mehrere Möglichkeiten, zwischen denen bei gegebener Auflösung nicht unterschieden werden kann. In Abb. 34c ist eine Möglichkeit gezeigt, bei der die Hauptkontakte zwischen den zytosolischen Loops von Sec61 α und den ribosomalen Proteinen rpL25 und rpL35, sowie der H50 und H53 der 25S-rRNA ausgebildet werden (C2 und C4). Der Kontakt C3 (u.a. H24) würde durch einen der N-terminalen zytosolischen Loops und C1 (u.a. zu H29) durch Sec61 γ vermittelt werden. Allerdings sind auch weitere Orientierungen vorstellbar, bei denen die zytosolischen Loops in die Verbindungen nahe H59 (C1) oder H24 (C3) gelegt werden.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die Auflösung für den RNC-Sec61-Komplex von über 15 Å auf unter 10 Å verbessert werden konnte. Insbesondere für das Ribosom sind dadurch sehr viele Details wie α -helikale Sekundärstrukturen sichtbar geworden. Obwohl die lokale Auflösung für den Liganden, Sec61, nicht ausreichend ist, um flexibles Docking zu erlauben, konnte durch eine aufwändige Sortierungsprozedur die bislang detaillierteste Elektronendichte-Karte für einen aktiven PCC erstellt werden. Die Interpretation dieser Dichte wirft die Frage auf, ob der aktive PCC tatsächlich ein Oligomer darstellt, denn obwohl auch ein *front-to-front*-Dimer nicht definitiv ausgeschlossen werden kann, erscheint es am wahrscheinlichsten, dass nur ein einziges Sec61 $\alpha\beta\gamma$ -Trimer im aktiven PCC von Hefe vorliegt.

3.5 Substratoptimierung

3.5.1 Generierung eines Substrates zur Reinigung von Membraninsertions-Intermediaten *in vivo* mit Hilfe der *HAC*-mRNA

Um die Translation eines gewünschten Substrats, beispielsweise eines Membranproteins, auch *in vivo* an einer definierten Stelle stoppen zu können, sollte eine *in vivo* Stoppkassette generiert werden. Als Werkzeug dafür soll die *HAC*-mRNA (Abb. 35a) verwendet werden. Eine Sequenz aus dem 3'-Intron der *HAC*-mRNA kann mit Sequenzen aus dem 5'-UTR-Bereich wechselwirken, was zur Attenuation der Translation des Hac1p-Proteins führt (Ruegsegger, Leber et al. 2001). Das *HAC*-Intron kann durch eine spezifische Exonuklease, Ire1p, gespalten werden, die mRNA-Loops an den 5'- und 3'-Speißstellen erkennt (Gonzalez, Sidrauski et al. 1999). Bei der UPR (*unfolded protein response*) wird diese Exonuklease aktiviert und das *HAC*-Intron gespleisst, was schließlich zur vollständigen Transkription des aktiven Hac1pⁱ-Proteins führt. Zur Generierung von *in vivo* Stoppsubstraten musste also das gewünschte Protein zwischen die 5'-*HAC*-UTR und die 3'-Stoppsequenz kloniert werden. Zusätzlich wurden die Spleißstellen des *HAC*-Introns durch PCR-Mutagenese mutiert, um das Spleißen *in vivo* durch Ire1p zu verhindern. Um die *HAC*-Stoppkassette *in vitro* zu charakterisieren, wurden Fusionskonstrukte aus *HAC*-5'-UTR und den ersten 90 Aminosäuren von Dipeptidylaminopeptidase B ohne (HAC-DP90) und mit (HAC-DP90-HAC) der 3'-Stoppequenz (HAC-CAS) wie in Kap. 2.2.9 beschrieben generiert (Abb. 35b, c).

Von diesen Konstrukten wurde mRNA mit Hilfe des mMessage mMachine-Kits[®] (Ambion) hergestellt. Eine gute Ausbeute an RNA war jedoch nur zu erreichen, wenn 5 µg DNA pro 20 µl Transkriptionsreaktion eingesetzt wurden. Das ist das Fünffache der für HA-DP90-mRNA benötigten Menge.

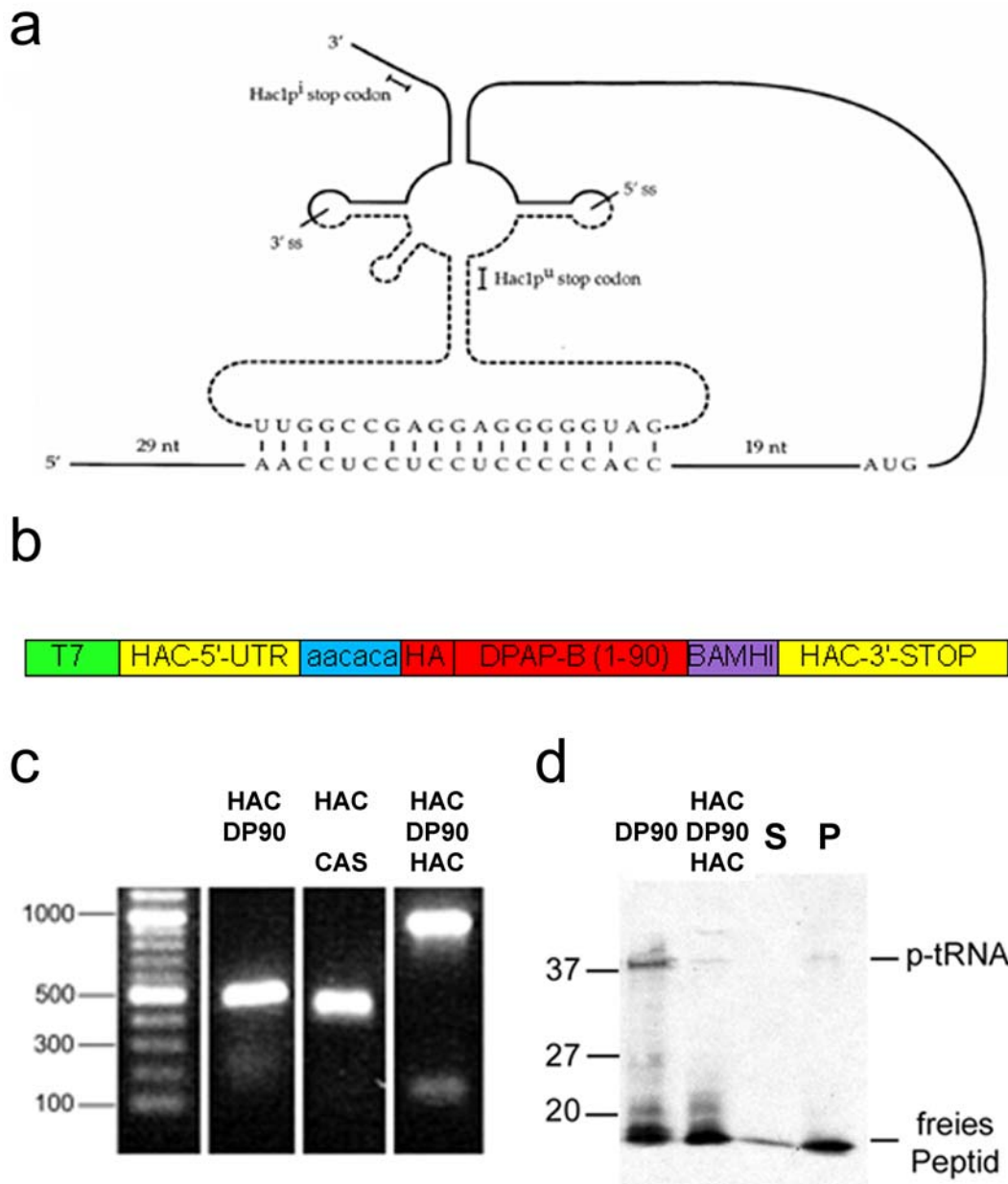


Abb. 35: Die HAC-mRNA als Translations-Stoppkassette zur Herstellung von RNCs in vivo. a, Modell der HAC-mRNA. Das Exon ist in mit durchgezogener Linie, das Intron mit gestrichelter Linie dargestellt. 5'- und 3'-Spleißstellen, die Stopcodons für die untranslatierte (Hac1p^u) und die translatierte Form (Hac1pⁱ) des Hac1p-Proteins sowie komplementäre Sequenzen aus der 5'-UTR und dem Intron sind angezeigt (Ruegsegger, Leber et al. 2001). b, Schema des Fusionskonstrukts aus HAC-5'-UTR, HAC-3'-Stoppkassette und den ersten 90 Aminosäuren von DPAP-B (DP90). c, Agarose-Gel der durch PCR generierten Fragmente HAC-DP90 und HAC-CAS. Diese beiden Fragmente wurden durch BamHI-Ligation zum Testkonstrukt HAC-DP90-HAC fusioniert. Dieses Konstrukt wurde im zellfreien Hefe-IVT-System getestet. Zudem wurden 50 µl des

Translationsansatzes auf ein Hochsalz-Sukrosekissen aufgetragen und die Ribosomen pelletiert. Aliquots von der Translationsreaktion mit HAC-DP90-HAC-mRNA sowie von der Überstand- und Pelletfraktion nach der Zentrifugation (jeweils 1/12) wurden durch SDS-PAGE und Western Blot unter Verwendung eines monoklonalen anti-HA-Antikörpers analysiert. Gezeigt ist der Film nach ECL-Reaktion (d). HA-DP90-mRNA wurde als Kontrolle verwendet. Siehe Text für Details.

Durch IVT in YTEs sollte die Stoppkassette nun getestet werden. Vor der Translation wurde die mRNA für 5 min bei 65°C erhitzt, um Sekundärstruktur zu denaturieren und danach sofort auf Eis gestellt. Um die Translationseffizienz zu optimieren wurden die Parameter Temperatur, Konzentration der mRNA, und Inkubationszeit variiert. Für die IVTs wurde der Translationsextrakt aus dem Stamm SRP68prA verwendet. Als Kontrolle wurde die mRNA von HA-DP90 translatiert.

Grundsätzlich war die Translation von HAC-DP90-HAC-mRNA immer schwächer als von HA-DP90-mRNA ohne HAC-Sequenzen. Die stärksten Signale für das HA-getaggtetes DP90-Protein nach Translation von HAC-DP90-HAC mRNA wurden bei 25°C bei einer mRNA-Konzentration von 0,2 µg/µl nach vergleichsweise kurzen Inkubationszeiten (10-20 min) beobachtet (Abb. 35d). Die Länge des translatierten Produkts entspricht der von HA-DP90. Dies ist ein Indiz dafür, dass die Stoppkassette funktioniert. Andernfalls würde ein längeres Produkt, das die letzten 20 Aminosäuren des untranslatierten Hac1p-Proteins enthält, translatiert werden. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass mit Hilfe der HAC-Kassette gestopptes HA-DP90-Peptid auch ribosomenassoziiert vorliegt.

Die IVT von HAC-Substraten erwies sich aber als sehr schwierig und schlecht reproduzierbar. Überdies sind verhältnismäßig große Mengen an mRNA erforderlich (0,2 µg/µl bei HAC-DP90-HAC gegenüber 0,04 µg/µl bei HA-DP90). Möglicherweise hat die mRNA eine starke Tendenz zur Ausbildung von Sekundärstruktur, wodurch die Translation stark inhibiert wird. Aufgrund dieser Schwierigkeiten *in vitro* wurden zunächst keine weiteren Versuche im Rahmen dieser Arbeit in Hinsicht auf eine Verwendung der HAC-Kassette für *in vivo* Stalling von Ribosomen unternommen.

3.5.2 Herstellung von Opsin-Konstrukten verschiedener Längen

Opsin ist ein gut charakterisiertes Modellprotein für das Studium polytopischer Membranproteine (Hoffman and Gilmore 1988; Ridge, Lee et al. 1995; Ridge, Lee et al. 1996; Okada, Ernst et al. 2001) (Abb. 36a). Es hat einen extrazellulären N-Terminus, der *in vivo* an zwei Stellen (N2 und N16) glykosyliert wird (Kaushal, Ridge et al. 1994) und einen zytoplasmatischen C-Terminus. Opsin hat 7 TM-Helices, wobei die erste TM-Helix als Signal-Anker-Sequenz dient (Friedlander and Blobel 1985). Die ersten vier Helices sind durch sehr kurze Loops verbunden, was dafür spricht, dass deren Integration in die ER-Membran nach dem Bündelungsmodell (Kap. 1.9, Abb. 14) verlaufen muss.

Da man diese Bündel durch Kryo-EM und 3D-Rekonstruktion bei hinreichender Auflösung visualisieren könnte, soll versucht werden, Insertionsintermediate von translokonassoziierten Ribosomen mit naszierender Opsinkette zu reinigen und Proben für Kryo-EM herzustellen.

Zunächst wurden Opsin-Konstrukte verschiedener Längen erzeugt. Die Länge der Substrate wurde dabei so gewählt, dass – gemäß dem Bündelungsmodell - entweder eine, zwei, drei oder fünf TM-Helices im PCC akkomodiert würden. Beim Entwurf der Konstrukte wurde auch die Tatsache in Betracht gezogen, dass sich TM-Helices im ribosomalen *Exit*-Tunnel falten können (Kowarik, Kung et al. 2002; Woolhead, McCormick et al. 2004; Lu and Deutsch 2005). Dies hat zu Folge, dass sich der Distanzgewinn pro Aminosäure von ca. 2,9 Å, in einer gestreckten Kette auf ca. 1,5 Å in einer α -Helix reduziert. Demnach ergeben sich beispielsweise für das Konstrukt Ops146 zwei prinzipielle Möglichkeiten (Abb. 36b, links). Falls sich Helices schon im Peptid-*Exit*-Tunnel falten, wäre die erste TM-Helix im PCC und die dritte TM-Helix im *Exit*-Tunnel akkomodiert. Die zweite TM-Helix hätte fast vollständig den *Exit*-Tunnel verlassen und wäre vermutlich auch gefaltet und partiell in den PCC inseriert. Falls sich keine α -Helices im Peptid-*Exit*-Tunnel ausbilden, werden mit großer Wahrscheinlichkeit die ersten beiden TM-Helices im PCC inseriert sein. Vollkommen offen ist jedoch, wie die TM-Helices orientiert sein werden, da in keiner der beiden Fälle aufgrund der Länge des Substrates die Möglichkeit besteht, dass die zweite TM-Helix, auf die eine extrazelluläre (lumenale) Domäne folgt, als Loop inserieren kann. Einfacher ist die Situation beim Konstrukt Ops188 (Abb. 36b, Mitte). Dort wären drei TM-Helices in den Kanal inseriert. Nach der letzten inserierten TM-Helix folgt eine zytoplasmische Domäne und die nachfolgende Sequenz ist – auch wenn sich die vierte TM-Helix im *Exit*-Tunnel faltet - lang genug - um eine korrekte Insertion der ersten 3 TM-Helices zu erlauben. Sehr ähnlich ist die

Situation beim Ops277-Konstrukt (Abb. 36b, rechts), bei dem zu erwarten ist, dass fünf TM-Helices den Peptid-*Exit*-Tunnel verlassen haben.

Als erster Schritt wurden mittels PCR Opsin-DNA-Fragmente verschiedener Längen generiert (s. Kap., 2.2.10 und Abb. 36c). Es konnte von allen Fragmenten mRNA hergestellt werden, die dann für IVT im Weizenkeim-System eingesetzt wurde. Mittels des HA-Tags konnten alle naszierenden Opsinfragmente außer den Voll-Längen-Substraten im Western Blot nachgewiesen werden (Abb. 36d). Allerdings wurden die Signale für das naszierende Opsinpeptid mit zunehmender Länge der Opsinfragmente schwächer, was eventuell auf eine geringere Effizienz der Translation oder beim Blotten dieser stark hydrophoben Proteine zurückzuführen ist.

Nachdem die IVT dieser Konstrukte erfolgreich etabliert wurde, sind nun Experimente zur kotranslationalen Insertion naszierender Opsinketten im *in vitro* System in Planung (vgl. Kap. 4.3).

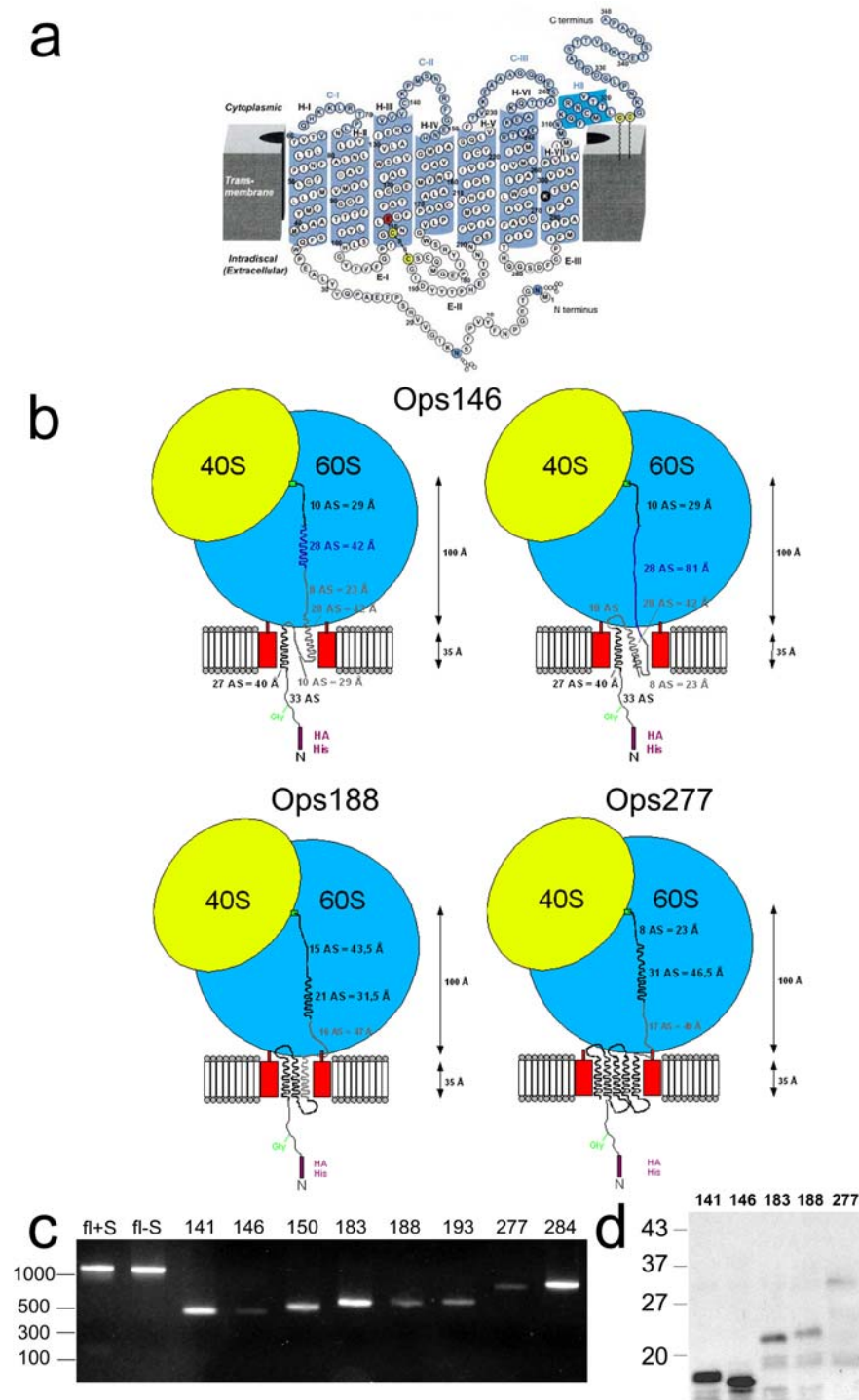


Abb. 36: Herstellung und IVT von naszierendem Opsin in verschiedener Länge. a, Schematische Darstellung des Opsins (Okada, Ernst et al. 2001). b, Schematische Darstellung der geplanten RNC-Sec61-Insertionsintermediate mit Opsinsubstraten verschiedener Längen. Die kleine UE ist gelb, die große UE blau, P-Stellen-tRNA grün, Sec61 rot dargestellt. Die naszierende Opsinkette ist schwarz dargestellt, außer die erste TM-Helix im Ops146-Konstrukt (dunkelblau) und Bereiche, wo unklar ist, wie die Orientierung nach Insertion in den PCC ist (grau). c, Agarose-Gel aller durch PCR generierten Opsin-Konstrukte. d, Analyse der IVT-Reaktionen im Weizenkeimsystem mit mRNA aus den Opsin-Konstrukten Ops 141, Ops146, Ops183, Ops188 und Ops277 durch Western Blot unter Verwendung eines monoklonalen Anti-HA-Antikörpers und ECL-Reaktion. Die freien Peptide können für alle Konstrukte nachgewiesen werden.

3.5.3 Reinigung von Ops146-RNCs und *in vitro* Rekonstitution mit gereinigtem trimeren Sec61-Komplex

Als Alternative zum DP120-RNC-Sec61-Komplex, bei dem die Elektronendichte von Sec61 wie oben dargestellt schwer zu interpretieren ist, sollte versucht werden, Sec61 an Weizenkeim-RNCs zu binden. Die Struktur des programmierten Weizenkeim-Ribosoms konnte bis zu einer Auflösung von 7 Å rekonstruiert werden (Halic et al., unpublizierte Daten). Deshalb besteht die Möglichkeit, einen Weizenkeim-RNC-Sec61-Komplex schnell bei einer Auflösung unter 10 Å rekonstruieren zu können. Dazu wurden zunächst RNCs vom Ops146-Konstrukt gereinigt. Dieses Konstrukt ist besonders interessant, weil es mit großer Wahrscheinlichkeit eine TM-Helix im ribosomalen *Exit*-Tunnel akkomodiert, die bei einer Auflösung von 10 Å visualisierbar sein müsste. Zudem enthält die naszierende Kette nur eine oder zwei TM-Helices, die den *Exit*-Tunnel verlassen haben. Deshalb sollte die Möglichkeit bestehen, Ops146-RNCs analog DP120-RNC *in vitro* mit dem Sec61-Komplex rekonstituieren zu können.

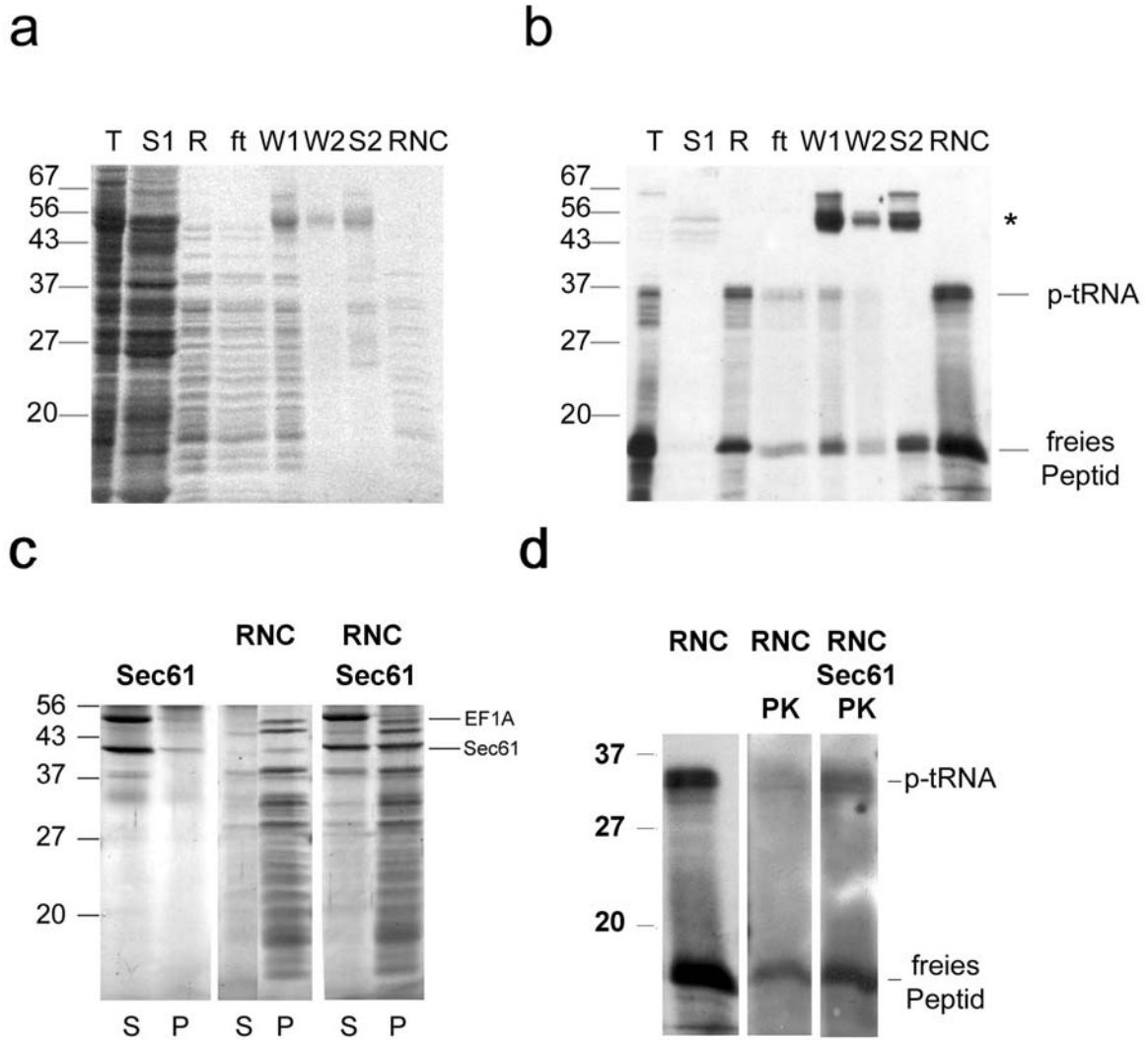


Abb. 37: Reinigung von His-HA-Ops146-RNCs und in vitro Rekonstitution mit gereinigtem Hefe-Sec61-Komplex. Eine trunkierte mRNA, die für die Aminosäuren 3-146 von bovinem Opsin mit N-terminalem His- und HA-Tag codiert, wurde in einem zellfreien Weizenkeim-IVT-System translatiert. RNCs wurden wie in Kap. 2.3.6 beschrieben gereinigt und Aliquots von Fraktionen durch SDS-PAGE und Western Blot unter Verwendung eines monoklonalen anti-HA-Antikörpers analysiert. Links (a) ist die Nitrocellulose-Membran nach Amidoschwarzfärbung, rechts (b) der Film nach ECL-Reaktion zu sehen. T, Translation (1/600); S1, Überstand (supernatant, 1/120); R, ribosomales Pellet (1/600) nach der ersten Zentrifugation; ft, Durchfluss (flowthrough) nach der Inkubation mit dem Säulenmaterial (1/600); W1, W2, Waschfraktionen (je 1/30); S2, Überstand und RNC-Pellet nach Elution mit Imidazol (je 1/30); RNAsin wurde durch einen Stern markiert; der Vergleich der Bandenintensität für die ribosomalen Proteine vor (R) und nach (RNC) der Reinigung mit der Signalintensität für freies Peptid und Peptidyl-tRNA (p-tRNA) auf dem Film zeigt die Anreicherung der RNCs. c, Bindung von gereinigtem Sec61-Komplex aus Hefe an Ops146-RNCs. RNCs wurden mit Sec61 im Überschuss in vitro rekonstituiert und durch Dichtegradientenzentrifugation fraktioniert. Überstand- (S, supernatant) und Pelletfraktionen (P) wurden über SDS-PAGE und nachfolgender Färbung mit SYPRO® Orange analysiert. Sec61 bindet an Ops146-RNCs, wohingegen eEF1A nicht mit den Ribosomen assoziiert ist. d, Proteaseprotektions-Experiment: Die Experimente wurden analog zum DP120-RNC-Sec61-Komplex durchgeführt. Gezeigt ist der Film nach Western Blot und ECL-Reaktion. Die naszierende Opsinkette wird durch den Sec61-Komplex vor der Protease geschützt.

Ops146-RNCs konnten erfolgreich nach IVT im Weizenkeimsystem gereinigt werden (Abb. 37a). Die Reinigung war hinsichtlich Anreicherung und Ausbeute an programmierten Ribosomen mit der von DP120-RNC aus Hefe-Translationsextrakten YTEs (Kap. 3.3.1) oder DP90-RNCs aus Weizenkeimlysat (Halic, Becker et al. 2004) vergleichbar. Des Weiteren konnten Ops146-RNCs erfolgreich *in vitro* mit gereinigtem Hefe-Sec61-Komplex rekonstituiert werden. Sec61 bindet mit hoher Affinität an Weizenkeim-Ops146-RNCs (Abb. 37b). Durch die Bindung von Sec61 erfolgt auch teilweise Protektion der naszierenden Opsinkette vor Proteinase K, was dafür spricht, dass die Signal-Anker-Sequenz von Opsin erfolgreich in den PCC insertiert (Abb. 37c). Daher sind hiermit die Voraussetzungen geschaffen worden, die erste Struktur eines PCC bei der Insertion von Membranproteinen, nämlich naszierendem Opsin, zu bestimmen.

4. Diskussion

In dieser Arbeit wurden zwei zentrale biochemische Vorgänge bei der Genese eines Proteins im Detail betrachtet, bei denen das Ribosom eine zentrale Komponente darstellt, nämlich der Elongationszyklus bei der Proteinsynthese und die kotranslationale Translokation in die ER-Membran. Aus dem Modellorganismus *S. cerevisiae* konnten ribosomale Komplexe mit dem pilzspezifischen Elongationsfaktor eEF3 einerseits und dem proteinleitenden Kanal, dem trimeren Sec61-Komplex, andererseits rekonstituiert und Kryo-EM-Strukturen dieser Komplexe gelöst werden.

4.1 Der eEF3-RNC-Komplex

Seit der Entdeckung von eEF3 Ende der 70er Jahre (Skogerson 1979) ist dieser pilzspezifische Elongationsfaktor Objekt intensiver Forschung, nicht zuletzt deshalb, weil das Verständnis der Struktur und Funktion von eEF3 den Grundstein zur Entwicklung eines wirkungsvollen Fungizids legen könnte. eEF3 wurde nach biochemischen Untersuchungen mit der Dissoziation von deacylierter tRNA von der ribosomalen E-Stelle in Zusammenhang gebracht und wurde deshalb als so genannter E-Stellen-Faktor charakterisiert (Uritani and Miyazaki 1988; Kamath and Chakraborty 1989; Triana-Alonso, Chakraborty et al. 1995). Bislang war jedoch nichts über die Struktur von eEF3 bekannt und über die Interaktion mit dem Ribosom gab es nur sehr wenige Daten. Die in diesem Jahr ermittelte Kristallstruktur von eEF3 (Andersen et al., 2005) bedeutete, zusammen mit der in dieser Arbeit präsentierten Kryo-EM-Struktur von ribosomengebundenem eEF3 einen wesentlichen Schritt auf dem Weg zum Verständnis der Struktur-Funktionsprinzipien dieses einzigartigen ABC-Kassetten-Proteins.

4.1.1 Bindung von eEF3 an das Ribosom an einer neuen Bindungsstelle: Interaktionen von HEAT- und die Chromo-Domäne

Durch Verwendung von gereinigten RNCs in Anwesenheit von AMP-PNP und dem Aminoglycosidantibiotikum Neomycin konnte ein stabiler eEF3-Ribosomen-Komplex hergestellt (Abb. 16) und eine Kryo-EM-Struktur ermittelt werden (Abb. 18). Dies ist die erste Struktur eines ABC-Proteins in ATP-Form im Komplex mit seinem Substrat, welches hier das Ribosom darstellt. (Abb. 19). eEF3 rearrangiert sich bei der Bindung an das Ribosom und benutzt eine völlig neue, nicht zuvor beschriebene ribosomale Bindungsstelle (Abb. 20), die den Kopf der kleinen 40S-UE und die zentrale Protuberanz der großen 60S-UE einschließt. Die Struktur bestätigt vorherige Daten, gemäß denen eEF3 mindestens zwei Interaktionsstellen mit dem Ribosom hat (Gontarek, Li et al. 1998; Kambampati, Pellegrino et al. 2000) (Kap. 1.5.4). Der Kontakt zum Ribosom wird zu Großteil durch zwei Proteinmodule, nämlich durch HEAT-*Repeats* und durch die Chromo-Domäne etabliert. Beide Module können sowohl Proteine als auch RNA und DNA binden, jedoch gab es zuvor sehr wenig strukturelle Daten hinsichtlich der Art und Weise, wie diese Domänen mit ihren Bindungspartnern interagieren. Die HEAT-Domäne von eEF3 kontaktiert den Kopf der kleinen 40S-UE auf eine für helikale *Repeats* sehr ungewöhnliche Weise mit den helixverbindenden Loops (Abb. 38a). Die Loops interagieren dabei sowohl mit Proteinen als auch mit rRNA (Helix 39). Eine Interaktion von HEAT-*Repeats* mit rRNA konnte bisher nur für das Autoantigen Ro gezeigt werden, das sowohl einzelsträngige als auch gefaltete rRNA binden kann (Stein, Fuchs et al. 2005). Das Ro-Antigen bildet dabei einen Toroid, bei dem die helixverbindenden Loops einen zentralen Hohlraum auskleiden, an den einzelsträngige RNA binden kann (Abb. 38b).

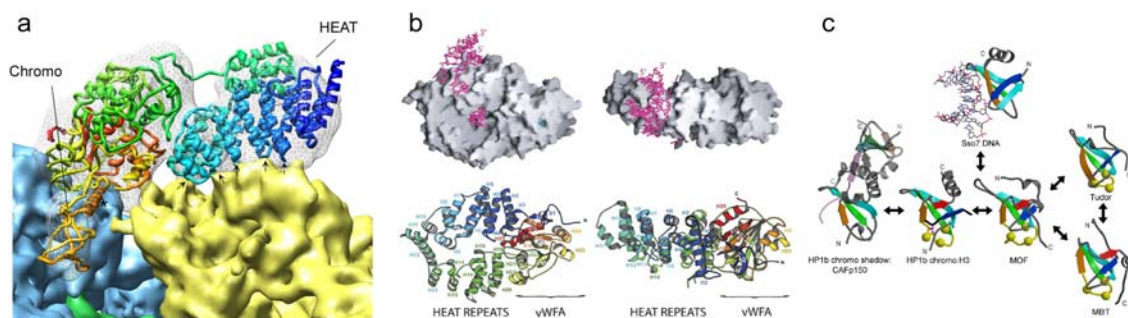


Abb. 38: HEAT- und Chromo-Domänen als Interaktionsmodule. a, Interaktion von HEAT- und Chromo-Domäne mit eEF3, gezeigt wie in Abb. 20c; Die C-terminale α -Helix der Chromo-Domäne ist mit einem Stern, die mit dem Ribosom interagierenden Loops der HEAT-Domäne mit Pfeilen gekennzeichnet. b, oben, Oberflächendarstellung des Autoantigens Ro (grau) mit gebundener Y-RNA (pink). Ro hat eine elliptische, toroidale Struktur mit einem zentralen Hohlraum. Ein Fragment der Y-RNA ist an der Außenseite von Ro gebunden während einzelsträngige RNA im zentralen Hohlraum gebunden wird. Unten, Ribbons-Darstellung der Ro-Struktur in Regenbogenfarben (blau am N-Terminus, rot an C-Terminus) in derselben Orientierung wie oben. Ro besteht aus HEAT-Repeats mit toroidaler Anordnung und einer Willebrand-Factor A (vWFA)-Domäne. Die α -Helices sind von H1 bis H25, β -Faltblätter von S1 bis S13 durchnummeriert (Stein, Fuchs et al. 2005). c, Die Familie der Chromo-Domänen: Gezeigt sind NMR-Strukturen von Vertretern verschiedener Subtypen der Chromo-Domänen-Familie, nämlich Chromo-Domäne (HP1b), Chromo-Barrel-Domäne (MOF), Chromo-Shadow-Domäne (HP1b), Tudor- und MBT (malignant brain tumor)-Domänen und strukturell verwandten Domänen des DNA-bindenden Proteins Sso7 aus Archaea. Die konservierten β -Faltblätter der Chromo-Domäne, β 2, β 3 und β 4 sind in türkis, grün und orange gezeigt. Der Loop zwischen β 3 und β 4 ist in gelb gezeigt. Zusätzliche β -Faltblätter, β 1 und β 5 bei Chromo-barrel-Domänen (MOF, MBT) sind in blau bzw. rot dargestellt. Man beachte das Fehlen der C-terminalen α -Helix bei MOF (Nielsen, Nietlispach et al. 2005).

Die 60S-UE wird durch die ABC2-Domäne und die Chromo-Domäne kontaktiert. Wie die HEAT-Domäne rearrangiert sich auch die Chromo-Domäne bei der Bindung an das Ribosom und bindet sowohl Proteine als auch rRNA. Die meisten Kontakte werden hier von der Sac7/Sso7-Homologie-Region (Robinson, Gao et al. 1998) (Reste 802-808) vermittelt. Diese Region stellt einen Loop zwischen zwei β -Faltblättern mit vier basischen Aminosäuren dar, über den die 5S-rRNA wahrscheinlich über das Phosphatrückgrat kontaktiert wird. Auffällig

ist, dass auch der N- und C-terminale Bereich der Chromo-Domäne mit dem Ribosom interagiert, wo es zu Konformationsänderungen kommt. Dies ist der Fall insbesondere am C-Terminus, wo sich in der Kristallstruktur eine lange α -Helix befindet, für die keine korrespondierende Elektronendichte gefunden werden konnte (Abb. 38a). Aus NMR-Strukturen von verschiedenen Subtypen von Chromo-Domänen ist jedoch bekannt, dass der betreffende Bereich auch unstrukturiert sein kann, so wie beispielsweise bei der *Chromo-barrel*-Domäne von MOF (Nielsen, Nietlispach et al. 2005) (Abb. 38c).

Als ein weiteres Bindungsmodul wurde der lysinreiche C-Terminus von eEF3 (Reste 980 – 1044) vermutet (Kambampati and Chakraborty 1997). Dieser ist jedoch in der Struktur delokalisiert und scheint nicht an der Bindung des Ribosoms beteiligt zu sein. Zudem konnte gezeigt werden, dass der C-Terminus nicht essentiell für die Funktion ist von eEF3 ist (Andersen, Anand et al. 2004). Die Bindung eines C-terminalen 30 kd-Fragmentes nach limitierter Proteolyse (Kambampati, Pellegrino et al. 2000) lässt sich aber dennoch erklären, da dieses Fragment auch die Sac7d-Homologie-Region der Chromo-Domäne enthält.

4.1.2 Kooperation und Konkurrenz mit anderen Elongationsfaktoren

Aus Koimmunopräzipitation, Experimenten mit GST-eEF3-Fusionsproteinen und ELISA-Tests gibt es Hinweise darauf, dass eEF1A mit eEF3 interagieren könnte (Kovalchuk, Kambampati et al. 1998). Aus der Kryo-EM-Struktur ist ersichtlich, dass eEF3 nicht an der Elongationsfaktor-Bindungsstelle, die von eEF1A und eEF2 genutzt werden, bindet. Es könnte demnach möglich sein, dass eEF1A und eEF3 gleichzeitig ans Ribosom binden, zumal die Bindung des ternären Aa-tRNA-eEF1A-GTP-Komplexes der auf die eEF3-Aktion folgende nächste Schritt im Elongationszyklus wäre. Eine direkte Interaktion von eEF1A mit eEF3 kann durch die Kryo-EM-Struktur jedoch nicht erklärt werden. Ein stimulatorischer Effekt von eEF1A auf die eEF3-Aktivität könnte aber allosterisch über das Ribosom vermittelt werden, beispielsweise durch Konformationsänderungen des Kopfes der kleinen 40S-UE (s.u.).

Konkurrenzexperimente mit eEF3 und eEF2 haben gezeigt, dass sich beide Faktoren aus der Bindung ans Ribosom verdrängen können (Kovalchuk, Kambampati et al. 1998). Wie die Struktur zeigt, bindet eEF3 an die ribosomale POST-Konformation. eEF2 jedoch bindet an Ribosomen in einer Konformation nach dem RSR (*ratchet-like subunit rearrangement*), bei dem die UEs gegeneinander rotieren und sich die Konformation der UEs, insbesondere am Kopf der kleinen 40S-UE ändert (Frank and Agrawal 2000; Spahn, Gomez-Lorenzo et al.

2004) (Kap. 1.4, Abb. 5 + 6). Da es hierbei zu einer Verschiebung der eEF3-Bindungsstellen kommt, kann erwartet werden, dass eEF3 an das Ribosom in dieser Konformation nicht binden kann. Dies wird durch Bindungsexperimente bestätigt, die zeigten, dass eEF3 nur zu geringem Maße an leere 80S-Ribosomen bindet (Abb. 16), die in einer Kontrollstruktur dieselbe Konformation wie im eEF2-80S-Sor-Komplex einnehmen.

4.1.3 eEF3 im Kontext mit dem Schaltermodell für ABC-Transporter

Ein wesentlicher Aspekt bei der molekularen Interpretation des eEF3-RNC-Komplexes war es, die Rolle der duplizierten ABC-Domänen zu verstehen. Ein gängiges Modell für die Funktionsweise von ABC-Transportern ist das Schalter-Modell (*switch model*), dem gemäß die Ausbildung und Dissoziation von ABC-Kassetten-Dimeren bei der Bindung bzw. Hydrolyse von ATP einen regulierbaren Schalter darstellt (Higgins and Linton 2004). Der Schalter wird durch stabile Bindung von ATP umgelegt, wobei das ABC-Dimer von der offenen in die geschlossene Konformation übergeht. Bei dieser Aktion kommt es zu einem krafterzeugenden Schlag (*power stroke*), der dann zum Substrattransport führt.

Der Ablauf des Funktionszyklus von ABC-Transportern gemäß dem Schaltermodell ist in Abb. 39 demonstriert. Der Transporter liegt in einer geöffneten Dimer-Konformation, wie in den Strukturen von BtuCD (Locher, Lee et al. 2002) oder RLI (Karcher, Buttner et al. 2005) beobachtet, vor. Diese Form hat eine hohe Affinität für das Substrat und eine niedrige Affinität für ATP. Im ersten Schritt bindet das Substrat an die Bindungsstelle, die meist in der Transmembrandomäne (*transmembrane spanning domain*, TMD) gelegen ist, und erhöht damit die Affinität für ATP in den nukleotidbindenden Domäne (*nucleotide binding domain*, NDB). Zwei Moleküle ATP binden nun kooperativ an die ABC-Kassette, was zur Ausbildung des geschlossenen Dimers, wie in Strukturen von Rad50 (Hopfner, Karcher et al. 2000) oder MJ0976 (Yuan, Blecker et al. 2001) beobachtet, führt. Im zweiten Schritt vermittelt das geschlossene Dimer eine Konformationsänderung in der TMD, exponiert die Substratbindungsstelle und reduziert die Affinität für das Substrat. Es kommt zum Transport durch den Kanal. Im dritten Schritt kommt es zur ATP-Hydrolyse und einem Übergangszustand, der noch transportkompetent ist. Nach der Hydrolyse beider ATP-Moleküle wird das geschlossene Dimer destabilisiert und nach sequenzieller Dissoziation von Phosphat und ADP wird der Ausgangszustand wiederhergestellt.

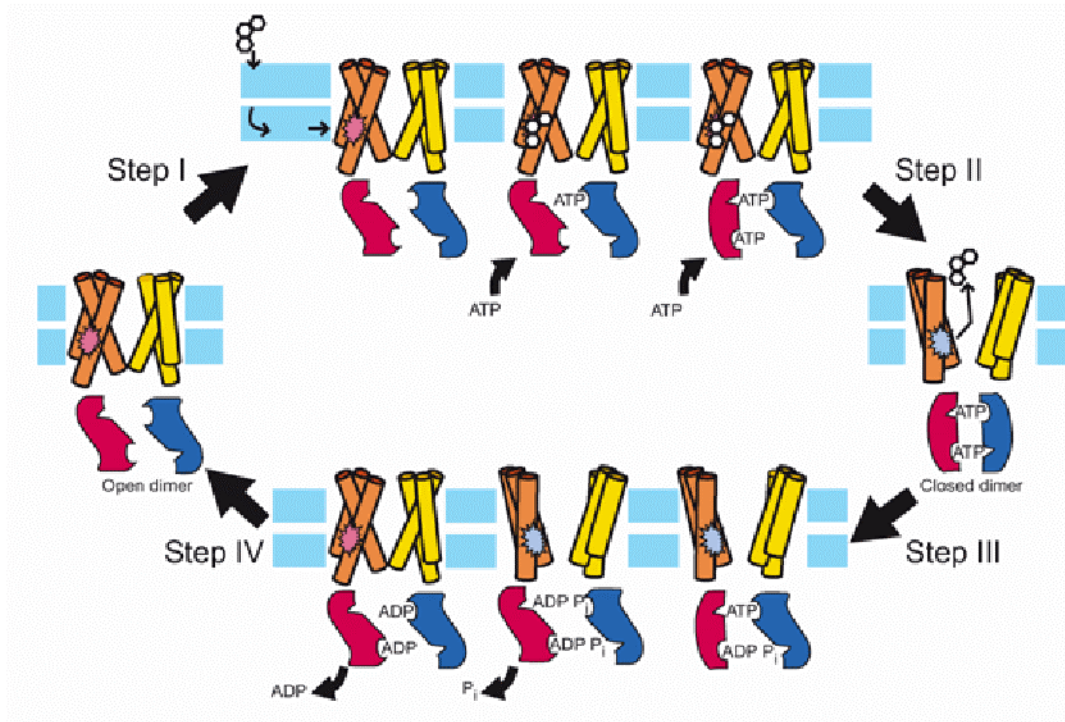


Abb. 39: Das Schalter-Modell (switch-Modell) für ABC-Transporter. TMDs sind in orange bzw. gelb, NBDs in rot bzw. blau skizziert. Die hochaffine Substrat-Bindungsstelle in der TMD ist rosa, die niedrig affine hellblau dargestellt. Schritt I: Substratbindung erhöht die Affinität für ATP in den NBDs. Schritt II: Nach Ausbildung des geschlossenen ATP-Dimers kommt es zum Substrat-Transport. Schritt III: ATP-Hydrolyse destabilisiert das geschlossene Dimer. Schritt IV: Nach Dissoziation von Phosphat und ADP wird die geöffnete ABC-Dimer-Form wiederhergestellt (Higgins and Linton 2004). Für Details s. Text.

Es bestehen mehrere Hinweise darauf, dass eEF3 sich, zumindest in den entscheidenden Schritten, gemäß dem Schaltermodell verhält. Aus den Bindungsstudien mit RNCs geht hervor, dass eEF3 nicht nur in Anwesenheit von ATP bzw. AMP-PNP, das heißt, im geschlossenen Dimer-Zustand, an RNCs bindet, sondern auch in der ADP- und apo-Form, in der eEF3 eine offene Dimer-Konformation einnehmen muss (Abb. 16b). Im Einklang mit dem Schalter-Modell würde die initiale Bindung von eEF3 an das Ribosom in offener Konformation stattfinden. Die Bindung an das Ribosom stimuliert dann die Ausbildung des geschlossenen Dimers, bei dem 2 Moleküle ATP gebunden sind. Wie der ATP-Schalter im Falle von eEF3 funktionieren könnte, wird durch die Modelle für eEF3 im offenen und geschlossenen Dimer-Zustand gezeigt. Beim Übergang vom offenen zum geschlossenen Zustand kommt es, wie auch bei ABC-Transportern beobachtet, zu weit reichenden Konformationsänderungen im gesamten eEF3-Molekül. So bewegen sich relativ zu den angenommenen Fixpunkten ABC2 und den ersten 5 HEAT-Repeats die ABC1-Domäne, die Chromo-Domäne, die C-terminalen HEAT-Repeats und das 4-Helix-Bündel in einer Art Klammerbewegung von einer offenen zu einer geschlossenen Konformation, wobei

zusätzliche Kontakte zum Ribosom ausgebildet werden (Abb. 23a). Interessanterweise sind im Modell für den offenen Dimer-Zustand ABC- und HEAT-Domäne so weit voneinander entfernt, dass sie nicht miteinander verbunden werden können. Das heißt, dass die Interaktion mit dem Ribosom eine Hybrid-Konformation zwischen offenem und geschlossenem Zustand induzieren oder stabilisieren muss. Dies würde auch erklären, wie die Bindung des Substrates, nämlich des Ribosoms, die Ausbildung des geschlossenen Dimers auslöst und durch Stimulation der ATP-Bindung die ATPase-Aktivität von eEF3 100-fach erhöht (Uritani and Miyazaki 1988). ATP-Hydrolyse ist für die katalytische Aktivität von eEF3 unbedingt notwendig, denn erst danach kann man deacylierte tRNA von der ribosomalen E-Stelle, stimuliert durch den ternären Aa-tRNA-eEF1A-GTP-Komplex, dissoziieren (Triana-Alonso, Chakraborty et al. 1995). Dies ist nicht ganz im Einklang mit dem Schaltermodell, gemäß dem die katalytische Aktivität, nämlich der Substrattransport, durch den krafterzeugenden Schlag (*power stroke*), nach ATP-Bindung verursacht wird. Dieser Unterschied läßt sich aber durch die Position von eEF3 am Ribosom erklären, die eine Dissoziation von E-Stellen-tRNA nicht zulassen würde. Erst die ATP-Hydrolyse führt schließlich zur Dissoziation von eEF3.

4.1.4 eEF3 als E-Stellen-Faktor

Der Faktor eEF3 befindet sich am Ribosom an einer Position in unmittelbarer Nähe der ribosomalen E-Stelle, von wo es möglich ist, sowohl den Kopf der 40S-UE als auch den flexiblen L1-*Stalk* zu beeinflussen. Von beiden Elementen ist bekannt, dass sie die Affinität von tRNA in der E-Stelle modulieren können (Yusupov, Yusupova et al. 2001; Ogle and Ramakrishnan 2004; Spahn, Gomez-Lorenzo et al. 2004). Hinsichtlich der Funktion von eEF3 als E-Stellen-Faktor wurden im Kontext mit der Tatsache, dass eEF3 grundsätzlich nach dem Modell für ABC-Transporter zu funktionieren scheint, zwei wichtige Beobachtungen gemacht, deren Bedeutung im Folgenden diskutiert werden soll.

Durch die Bindung ans Ribosom und den konformationellen Schalter rotiert die Chromo-Domäne um mehr als 50° in Richtung der L1-Protuberanz, die sich in der Kryo-EM-Struktur in *out*-Konformation befindet. Diese Bewegung korreliert mit der Bewegung des L1-*Stalks* zwischen den für dieses flexible Element beobachteten Extrempositionen (Abb. 23b), wodurch sich ein funktionaler Zusammenhang dieser beiden Bewegungen geradezu aufdrängt. Möglicherweise kann die Chromo-Domäne den L1-*Stalk* aktiv von der *in*-Position, in der sie nach Bindung von eEF2 gefunden wurde, in die *out*-Position stoßen, was in Analogie mit dem Schaltermodell dem Substrattransport nach dem krafterzeugenden Schlag

gleichkommen würde. Auf jeden Fall aber stabilisiert die Chromo-Domäne in der beobachteten Position die *out*-Konformation von L1, was eine Voraussetzung für die Freisetzung der E-Stellen-tRNA ist, da L1 in *in*-Position die tRNA in der E-Stelle blockiert (Spahn, Gomez-Lorenzo et al. 2004). Deshalb scheint ein wichtiger Aspekt der eEF3-Funktion die Öffnung der E-Stelle durch Entfernung der L1-Protuberanz zu sein. Dies erscheint vor allem für die Hefe *S. cerevisiae*, ein Organismus, in dem eEF3 essentiell ist, erforderlich zu sein, da dort die größten Bewegungen des L1-*Stalks* beobachtet wurden (Gomez-Lorenzo, Spahn et al. 2000).

Die Bindung von eEF3 an das Ribosom verursacht auch ein Rearrangement der HEAT-Domäne, die am Kopf der kleinen Untereinheit bindet. Es ist bekannt, dass die Affinität für tRNA in der E-Stelle durch geringfügige Konformationsänderungen im Kopf der 40S moduliert werden kann (Yusupov, Yusupova et al. 2001; Ogle and Ramakrishnan 2004; Spahn, Gomez-Lorenzo et al. 2004). So ist es denkbar, dass durch den konformationellen Schalter in eEF3 eine Konformationsänderung des 40S-Kopfes über die HEAT-Domäne vermittelt wird, was in der Folge die Eigenschaften der E-Stelle verändert. Auf diesem Wege könnte eEF3 die Affinität für deacylierte tRNA in der E-Stelle indirekt senken. Durch die Position der Chromo-Domäne verschließt jedoch eEF3 selbst die E-Stelle teilweise. Darüber hinaus ist der Kopf der 40S nach eEF3-Bindung, in einer starren Position fixiert. Deshalb ist es sehr wahrscheinlich, dass die Dissoziation der E-Stellen-tRNA von der Dissoziation von eEF3 und damit von der ATP-Hydrolyse abhängig ist. Erst dann ist die E-Stelle komplett offen und der Kopf der 40S ist aus seiner starren Position befreit. Dieses Funktionsmodell wäre im Einklang mit den biochemischen Befunden, gemäß denen die Dissoziation von E-Stellen-tRNA von der ATP-Hydrolyse abhängig ist, die wiederum die Dissoziation von eEF3 vom Ribosom verursacht (Triana-Alonso, Chakraborty et al. 1995).

Mit diesem Modell könnte zudem die Stimulierung der eEF3-Bindung an das Ribosom durch Neomycin erklärt werden. Es wurde gezeigt, dass Neomycin bei der Elongation die A-Stellen-Besetzung mit ternärem Aa-tRNA-EF-Tu-GTP-Komplex verhindert (Hausner, Geigenmüller et al. 1988). Biochemische und strukturelle Daten zeigen, dass Neomycin an in die ribosomale A-Stelle bindet (Moazed and Noller 1987; Francois, Russell et al. 2005) und dadurch die von eEF3 favorisierte Konformation des Kopfes stabilisieren könnte.

4.1.5 Erweiterter Elongationszyklus für die Proteinbiosynthese in Pilzen (*fungi*)

Auf Basis der genannten Befunde wird ein Modell vorgeschlagen, in dem die Rolle von eEF3 im Elongationszyklus von Pilzen beschrieben werden soll. Dabei wurde der Zyklus um *fungi*-spezifische POST-Zustände für das Ribosom erweitert (Abb. 40).

- (i) Nachdem, katalysiert durch eEF2, tRNA-Translokation stattgefunden hat, befindet sich der L1-*Stalk* in der *in*-Konformation und Kopf der kleinen 40S-UE in einer Position, die die hohe Affinität der E-Stelle für tRNA beibehält. Dieser Zustand wird geschlossener POST-Zustand (Post, *closed* E) genannt.
- (ii) eEF3 bindet in einer offenen oder teilweise offenen Dimer-Konformation an das Ribosom. Diese anfängliche, schwache Bindung findet statt, ohne die ribosomale Konformation zu verändern. Dieser Zustand wird geschlossener POST*-Zustand genannt (Post*, *closed* E).
- (iii) Die Wechselwirkung mit dem Ribosom löst die ATP-abhängige Ausbildung des geschlossenen Dimerzustandes von eEF3 aus. Dies führt zu einer hochaffinen Bindung an das Ribosom und zu der in der Kryo-EM-Struktur beobachteten Konformation. Der molekulare Schalter führt zu einem Rearrangement der Chromo-Domäne, was ein Rearrangement der L1-Protuberanz zur Folge hat, die sich nun in der *out*-Konformation befindet. Obwohl dies die ribosomale E-Stelle öffnet, bleibt diese teilweise durch eEF3 selbst verschlossen, der wiederum die Konformation des Kopfes der 40S-UE einfriert. Dieser Zustand wird POST* genannt (Post*).
- (iv) Durch das geschlossene Dimer wird die Hydrolyse von ATP stimuliert, was zur Dissoziation von eEF3 vom Ribosom führt. Dies befreit den Kopf der 40S-UE aus der starren Konformation und führt zu einer nun vollständig geöffneten E-Stelle mit niedriger Affinität für deacylierte tRNA, die den klassischen POST-Zustand darstellt (Post).
- (v) Nun kann Aa-tRNA-eEF1A-GTP die nächste tRNA an die ribosomale A-Stelle bringen. Gemäß dem allosterischen 3-Stellen-Modell würde eine geschlossene E-Stelle, von der keine tRNA dissoziieren kann, die Bindung von tRNA in der A-Stelle verhindern, da A- und E-Stelle reziprok miteinander gekoppelt sind.

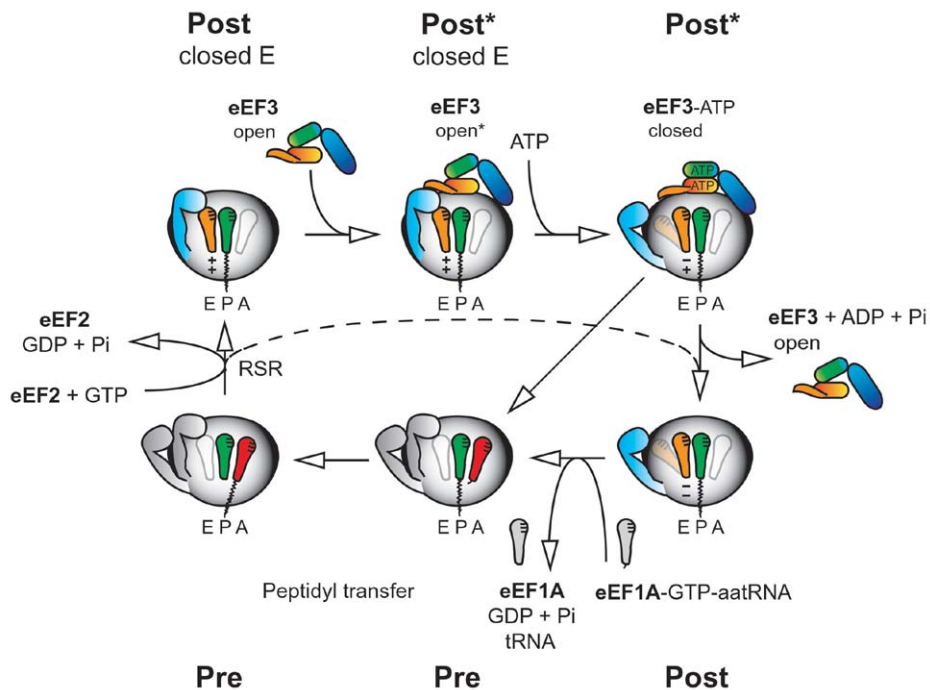


Abb. 40: Modell für die Rolle von eEF3 im erweiterten Elongationszyklus von Pilzen. Oben links: POST-Zustand des Ribosoms, das begünstigt durch die in-Konformation des L1- Stalks und die Konformation des Kopfes der kleinen 40S-UE eine hohe Affinität für E-Stellen-tRNA hat (Post, closed E). Oben Mitte: Initiale Interaktion von eEF3 in einer offenen oder intermediären Konformation des ABC-Kassetten-Dimers (Post*, closed E) Oben rechts: Die Interaktion mit dem Ribosom stimuliert die ATP-abhängige Ausbildung des geschlossenen ABC-Dimers in eEF3, das nun mit hoher Affinität an das Ribosom bindet (Post*). Durch den molekularen Schalter ändert sich die Konformation der Chromo-Domäne und der L1- Stalk wird in der out-Position stabilisiert. eEF3 selber verschließt dabei die E-Stelle und blockiert die Bewegung des Kopfes der kleinen 40S-UE. Unten rechts: Das geschlossene Dimer verursacht die ATP-Hydrolyse was zur Dissoziation von eEF3 führt. Dies öffnet die E-Stelle und befreit den Kopf der kleinen 40S-UE, was zu einer geringeren Affinität für E-Stellen-tRNA führt. (Post). Jetzt kann der Aa-tRNA-eEF1A-GTP-Komplex an die A-Stelle binden und die tRNA in der E-Stelle wird freigesetzt. ATP-Hydrolyse in eEF3, Dissoziation der tRNA und Besetzung der A-Stelle durch eEF1A könnten jedoch auch gleichzeitig stattfinden.

Da eEF3 und eEF1A gemeinsam an das Ribosom binden können, besteht die Möglichkeit, dass ATP-Hydrolyse von eEF3, tRNA-Freisetzung und A-Stellen-Besetzung durch eEF1A konzertiert, das heißt, gleichzeitig erfolgen können.

4.1.6 Ist die ribosomale Bindungsstelle für eEF3 auch außerhalb der Translation in Pilzen bedeutsam?

In den letzten Jahren wurden einige eEF3-ähnliche Proteine gefunden, beispielsweise GCN20 (Vazquez de Aldana, Marton et al. 1995), ABC50 (Tyzack, Wang et al. 2000) oder RLI1 (Dong, Lai et al. 2004) die auch an das Ribosom binden können und in die Translationskontrolle involviert sind. Eine besondere Erwähnung im Zusammenhang mit der eEF3-Struktur verdient das Protein GCN1. GCN1 wurde zuerst in Hefe entdeckt (Marton, Crouch et al. 1993), scheint aber ubiquitär zu sein und besitzt eine Domäne, die homolog zu der HEAT-Domäne von eEF3 ist (Marton, Vazquez de Aldana et al. 1997). Die genaue Analyse von Sequenzalignments (Abb. 41) verschiedener GCN1-Proteine hat ergeben, dass die größte Sequenzidentität mit der HEAT-Domäne von eEF3 in den Bereichen besteht, die das Ribosom binden.

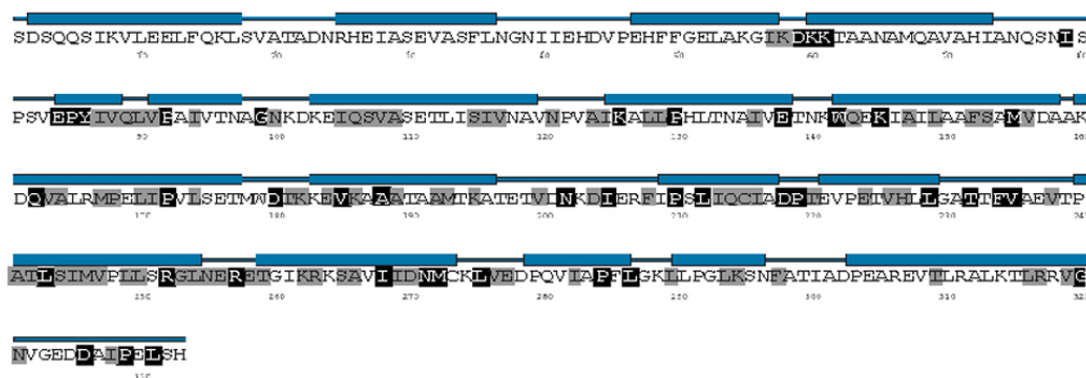


Abb. 41: Resultat aus Sequenzalignments der HEAT-Domäne von eEF3 mit GCN1 aus Hefe, Maus, Mensch und Zebrafisch. Die blauen Balken repräsentieren die α -Helices in der HEAT-Domäne. Schwarz unterlegte Reste sind in allen Proteinen konserviert, grau unterlegte Reste haben ähnliche Aminosäuren an der entsprechenden Position.

Aus diesem Grunde ist es durchaus wahrscheinlich, dass zumindest die ribosomale Bindungsstelle für die HEAT-Domäne nicht allein spezifisch für *Fungi* ist. Darüber hinaus bildet GCN1 einen funktionalen Komplex mit GCN20, einem ABC-Kassetten-Protein, dessen NBDs streng homolog zu denen von eEF3 sind. Jedoch besitzt GCN20 keine Chromo-Domäne. Der GCN1/GCN20-Komplex bindet das Ribosom und rekrutiert den Faktor GCN2 an das Ribosom. Dieser besitzt einen Sensor für deacylierte tRNA in der A-Stelle, die nur dann gehäuft an das Ribosom bindet, wenn ein Mangel an Aminosäuren in der Zelle vorliegt. Als zelluläre Antwort auf den Aminosäuremangel phosphoryliert GCN2 den Initiationsfaktor

eIF2, was in der Folge zur Inhibition der Initiation und zur Stimulation der Biosynthese von Aminosäuren führt (Marton, Vazquez de Aldana et al. 1997).

Aufgrund der Homologie mit der HEAT-Domäne erscheint es wahrscheinlich, dass GCN1 die eEF3-Bindungsstelle an der kleinen 40S-UE benutzt. Somit wäre der sehr große (fast 400 kd) GCN1/GCN20-Komplex an einer Stelle unweit der ribosomalen A-Stelle auf dem Ribosom positioniert, die ideal ist, um GCN2 als Sensor für unbeladene tRNA in der A-Stelle zu koordinieren.

Es erscheint also wahrscheinlich, dass die neue Bindungsstelle eine universelle Adapterstelle ist, die nicht nur von pilzspezifischen Elongationsfaktoren genutzt wird, sondern auch von Liganden, die eine wesentliche Rolle in der Translationskontrolle spielen, wie z.B. das GCN1/GCN20-System.

4.1.7 Ausblick

Obwohl die Struktur des eEF3-RNC-Komplexes einen großen Schritt auf dem Weg zum Verständnis der Funktion dieses einzigartigen Translationsfaktors beigetragen hat, bleiben viele Fragen offen. Im Zusammenhang mit dem Schaltermodell für ABC-Transporter bleibt zu klären, in welchem Nukleotid-Zustand eEF3 *in vivo* während des Elongationszyklus an das Ribosom bindet. Da die Konzentration von ATP in der Zelle höher ist als die von ADP, erscheint eine ATP-Form von eEF3 wahrscheinlicher zu sein. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass EF-G in der GDP-Form an das Ribosom bindet, wo es dann zu einem schnellen Nukleotidaustausch von GDP nach GTP kommt (Zavialov, Hauryliuk et al. 2005). Für eEF3 fehlen jedoch bislang verlässliche Daten über Dissoziationskonstanten. Kinetische Messungen analog den Arbeiten an EF-G könnten jedoch darüber Aufschluss bringen. Zusätzlich könnte versucht werden, die Struktur von eEF3 im offenen Dimerzustand im Komplex mit dem Ribosom zu lösen. Die vorliegenden Bindungsstudien liefern Hinweise darauf, dass auch stabile eEF3-ADP-RNC-Komplexe generiert werden könnten. Des Weiteren kann man versuchen, 80S-Ribosomen mit tRNAs in P- und E-Stelle zu besetzen um dann eEF3 daran zu binden. Dieser Komplex wäre dem postulierten *fungi*-spezischen posttranslokationalem Zustand (POST*-Zustand) während der Elongation ähnlicher als der vorliegende Komplex ohne E-Stellen-tRNA.

4.2 Der RNC-Sec61-Komplex

Proteintransport durch die Membran des endoplasmatischen Retikulums ist ein entscheidender Schritt bei der Biosynthese vieler Proteine. Dabei werden einerseits lösliche Proteine, die aus der Zelle sekretiert werden oder ins Lumen des endoplasmatischen Retikulums gelangen sollen, andererseits Membranproteine, deren Bestimmungsort die Plasmamembran oder andere Organellen des sekretorischen Pfades sind, durch den PCC transloziert bzw. integriert. Der PCC, der trimere Sec61-Komplex in Eukaryoten oder SecYEG-Komplex in Prokaryoten, ist seit vielen Jahren Objekt intensiver Forschung. Obwohl die dreidimensionale Struktur eines inaktiven PCC aus dem Archaea-Bakterium *M. jannaschii* aufgeklärt werden konnte (Van den Berg, Clemons et al. 2004), bleibt bis heute die Frage nach der Struktur des aktiven Zustandes unbeantwortet. Die biophysikalische Charakterisierung des aktiven PCC führte bislang zu vielen zum Teil widersprüchliche Daten hinsichtlich des Durchmessers der Pore im aktiven Zustand und sowie des Oligomerisierungsgrades. Beispielsweise wurde die Porengröße durch Fluoreszenzlöschung auf 40-60 Å im Durchmesser geschätzt, während bei EM- und Röntgenkristallostrukturen eine wesentlich kleinere Pore (7-15 Å) visualisiert wurden. Ähnliche Diskrepanzen gibt es hinsichtlich des oligomeren Zustands im aktiven PCC. Viele Arbeiten lassen vermuten, dass der PCC im aktiven Zustand als ein Oligomer aus mehreren Kopien des trimeren Sec61-Komplexes vorliegt (vgl. Kap. 1.8.6). Die Interpretation von verschiedenen Kryo-EM-Strukturen ribosomengebundener Sec61-Komplexe lieferte bisher ein Tetramer für den RNC-Sec61-Komplex aus *Mammalia* (Menetret, Hegde et al. 2005), ein Trimer für den RNC-Sec61-Komplex aus *S. cerevisiae* (Beckmann, Spahn et al. 2001), und ein Dimer wird für den RNC-SecYEG-Komplex aus *E. coli* (Mittra, Schaffitzel et al. 2005) postuliert. Keine dieser Strukturen erlaubte jedoch eine eindeutige Analyse auf molekularer Ebene. Deshalb war es Ziel dieser Arbeit, mittels Kryo-EM eine Struktur des aktiven PCC aus Hefe bei der Translokation bei einer Auflösung zu ermitteln, die ausreichend für eine zuverlässige molekulare Interpretation ist. Dies ist zugleich Voraussetzung für strukturelle Arbeiten am PCC bei der Integration von Membranproteinen.

4.2.1 Experimenteller Ansatz

Um das oben genannte Ziel zu erreichen, wurde der selbe experimentelle Ansatz, der 2001 zur Kryo-EM-Struktur des DP120-RNC-Sec61-Komplexes in Detergenzlösung bei 15,4 Å führte (Beckmann, Spahn et al. 2001), verwendet und verbessert. Als erster Schritt wurde hierbei zunächst die Präparation von programmierten Ribosomen vereinfacht und hinsichtlich Ausbeute und Reinheit optimiert (s. Kap. 3.3.1). Funktionale Komplexe aus RNCs und mit Detergenz gereinigtem trimeren Sec61-Komplex wurden *in vitro* rekonstituiert und in Bindungsstudien sowie durch Proteaseprotektions-Experimente erfolgreich auf ihre Funktionalität überprüft. Es ist anzumerken, dass sich der PCC in diesem Komplex nicht in der physiologischen chemischen Umgebung nativer Membranen befindet. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass gereinigter Sec61-Komplex auch in Detergenzlösung aktiv ist (Gorlich and Rapoport 1993). Zudem zeigten weitere Kryo-EM-Rekonstruktionen von RNC-PCC-Komplexen sowohl für gereinigten PCC als auch für den PCC aus nativen Membranen sehr ähnliche Strukturen (Menetret, Neuhof et al. 2000; Morgan, Menetret et al. 2002). Deshalb erschien der beschriebene RNC-PCC-Komplex als geeignet, um eine hochaufgelöste Struktur des aktiven PCC zu erreichen.

4.2.2 Sortierung des DP120-RNC-Sec6

Als grundlegendes Problem bei der 3D-Rekonstruktion des DP120-RNC-Sec61-Komplexes stellte sich die Inhomogenität des Datensatzes, insbesondere in Bereich der ribosomalen *Exit*-Stelle, wo Sec61 bindet, heraus. Deshalb war zunächst eine umfangreiche Sortierungsprozedur nötig, deren Schwerpunkt bei der Sortierung des flexiblen Expansionssegmentes ES27 (Abb. 28) lag. Im Gegensatz zur RNC-Sec61-Struktur von 2001, wo ES27 fast ausschließlich in L1-Konformation vorlag, wurde ES27 hier zu einem beträchtlichen Anteil (> 40%) in *Exit*-Konformation gefunden. ES27 in *Exit*-Position überlagert sich mit der Dichte von Sec61 und erschwert somit ihre Interpretation.

Ein großer Teil von ES27 konnte heraussortiert werden, dennoch enthält die Sec61-Dichte noch Spuren, die von ES27 stammen könnten (Abb. 30). Diese restlichen Partikel mit ES27 in *Exit*-Position konnten jedoch nicht mehr von den Sec61-gebundenen Partikeln getrennt werden. Die Rolle von ES27 ist unklar, aber es wird diskutiert, dass diese rotierende rRNA-Struktur den Zugang nicht-ribosomaler Faktoren an die naszierende Kette koordiniert. Solche Faktoren wären beispielsweise SRP, Chaperone, Proteine, die mit der naszierenden Kette

interagieren, oder diese modifizieren, oder der PCC. Möglicherweise interagiert ES27 auch direkt mit der naszierenden Kette (Beckmann, Spahn et al. 2001). Vermutlich ist ES27 in der Kryo-EM-Probe teilweise noch mit einem weiteren Protein, wahrscheinlich sogar mit Sec61 selbst assoziiert, wodurch die Dichte an der *Exit*-Stelle größer wird und diese Partikel bei der Sortierung deswegen eine größere Korrelation zu der Sec61-gebundenen Referenzstruktur haben.

4.2.3 Docken atomarer Modelle in die Elektronendichte für den aktiven Sec61-Komplex

Die isolierte Dichte für den Sec61-Komplex ist derjenigen aus der Rekonstruktion von 2001 sehr ähnlich (Abb. 42b). Sie hat eine konvexe, nach außen hin abgerundete Struktur. Die Elektronendichte des SecYE β -Komplexes aus der Kristallstruktur zeigt bei gleicher Auflösung eine eher konkave, nach innen gewölbte Struktur (Abb. 42c). Diese konvexe Erscheinung der Sec61-Dichte könnte dadurch erklärt werden, dass möglicherweise die Mizelle, die die hydrophoben Bereiche des Sec61-Komplexes umgibt, teilweise visualisiert wird.

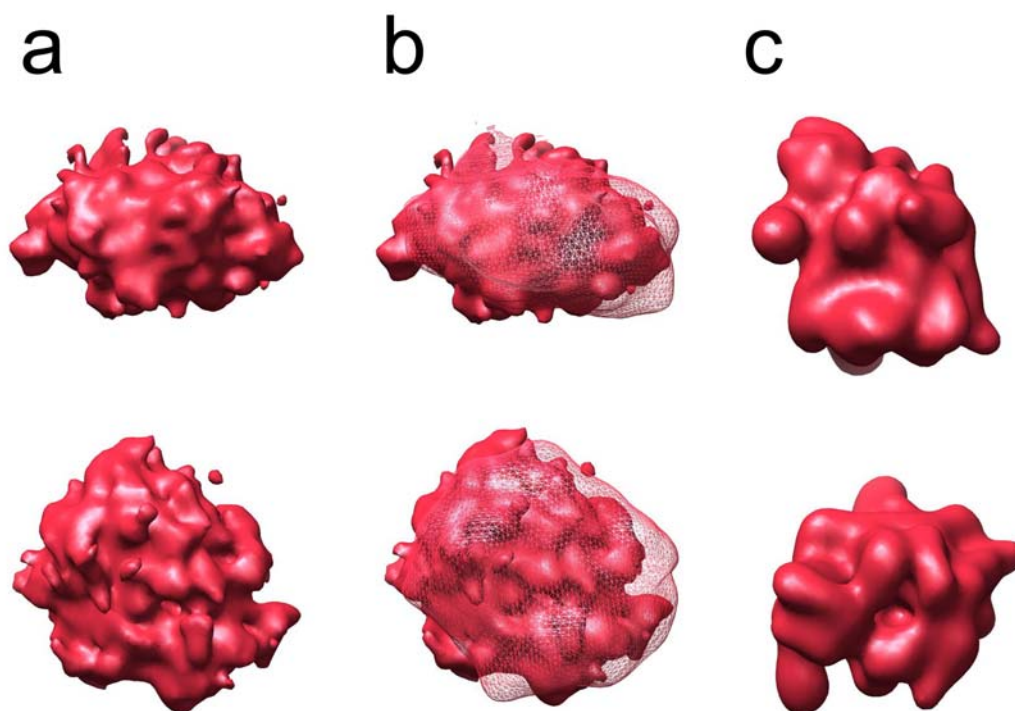


Abb. 42: Vergleich der isolierten Dichten des trimeren Sec61-Komplexes aus der finalen 3D-Rekonstruktion mit der 3D-Rekonstruktion von Beckmann, 2001 und der theoretischen Elektronendichte des geöffneten Monomers.

a, isolierte Elektronendichte der finalen 3D-Rekonstruktion, gezeigt von der Seite (oben) und von oben (unten) wie in Abb. 33. b, Vergleich mit der isolierten Elektronendichte aus Beckmann, 2001, die in Maschendrahtdarstellung gezeigt ist. c, mit dem Programm SPIDER berechnete theoretische Elektronendichte des Modells für das geöffnete Sec61-Monomer.

Die Kanal-Dichte bestätigt alle Verbindungen zum Ribosom (C1-C4), die schon 2001 gefunden wurden (Abb. 32b). Zusätzlich kann man, von oben betrachtet, eine Pore erkennen, die sich exakt unterhalb des Peptidunnel-Ausgangs befindet (Abb. 33). Es wurde versucht, die bisher diskutierten oligomeren Strukturen für den aktiven Sec61-(SecYEG-)Komplex in die Kryo-EM-Dichte zu docken (Abb. 34). Dazu wurden die Pore und die Verbindungen zu Ribosom als Beschränkungen für das Docken verwendet. Zudem wurde in Betracht gezogen, dass die visualisierte Dichte durch Interferenz mit ES27 in *Exit*-Position und eventuell mit der Mizelle an den Randbereichen größer ist. Unter diesen Umständen ist es nicht möglich, Trimere oder Tetramere in die Kryo-EM-Dichte einzupassen. Von den beiden in der Literatur diskutierten Möglichkeiten für ein Dimer kann zudem eine *back-to-back*-Anordnung ausgeschlossen werden. Die geöffnete *front-to-front*-Anordnung füllt die Dichte bei sehr niedrigen Konturwerten weitestgehend aus, Details können aber bei der Auflösung weder bestätigt noch widerlegt werden.

Die Möglichkeit, die am besten durch die aktuellen Daten repräsentiert wird, ist ein einziger trimerer Sec61-Komplex (Monomer) im aktiven Zustand. Ein geöffnetes Monomer passt in die Kerndichte des isolierten Sec61-Komplexes, welche auch bei hohen Konturwerten noch sichtbar ist und würde die Pore erklären. Jedoch ist die lokale Auflösung für die PCC-Dichte bislang limitiert (vgl. dazu auch Kap. 4.4), so dass sich eine molekulare Interpretation auf Basis von α -helikaler Sekundärstruktur nicht durchführen lässt. Somit ist es nicht möglich, die genaue Orientierung eines Monomers festzulegen oder die Verbindungen zum Ribosom auf molekularer Ebene zu erklären.

4.2.4 Ist Sec61 im aktiven Zustand ein Monomer?

Bislang herrscht die Meinung vor, dass der SecYEG/Sec61-Komplex im aktiven Zustand als Oligomer arrangiert ist. Aus der Kristallstruktur von SecYE β kann jedoch der Schluss gezogen werden, dass nur eine einzige Kopie des SecYEG-Komplexes funktional sein kann. Dieser Befund wurde durch weitere Experimente zusätzlich bestärkt. Zum einen konnte aus Vesikeln von der inneren Membran von *E. coli* (IMV, *inner membrane vesicle*), die getaggetes und ungetaggetes SecE in gleichen Mengen enthielten, niemals ungetaggetes SecE mit

getagtem SecE koimmunopräzipitiert werden (Yahr and Wickner 2000). Bei einem anderen Experiment wurden mit Detergenz solubilisierter Translokationsintermediate untersucht. Hier wurde nur eine Kopie des SecYEG-Komplexes, assoziiert mit einem SecA-Molekül und einem Substratmolekül, gefunden, was durch Immunopräzipitation und native Gelelektrophorese gezeigt werden konnte (Duong 2003). Die hier präsentierte Kryo-EM-Struktur des ribosomengebundenen Sec61-Komplexes unterstützt die Idee, dass die aktive Form des PCC ein Monomer ist, auch wenn ein Dimer nicht vollkommen ausgeschlossen werden kann. Es besteht zusätzlich die Möglichkeit, dass der Oligomerisierungsgrad von Sec61 durch die Reinigung in Detergenz (Digitonin) zugunsten des Monomers beeinflusst wird. Digitonin ist wie DBC jedoch ein sehr mildes Detergenz, in dem die meisten getesteten heterooligomeren Membranproteine intakt bleiben. Zudem konnte durch Bindungsstudien und Proteaseprotektionsexperimente eine produktive Interaktion mit dem Ribosom und der naszierenden Polypeptidkette gezeigt werden (Abb. 25).

Dennoch bleibt die Frage offen, weshalb viele Experimente auf ein oligomeres Arrangement des aktiven Hefe-PCC schließen lassen. Sicherlich steht außer Frage, dass der PCC als hydrophobes Membranprotein eine Tendenz zur Oligomerisierung aufweist. Es wurde gezeigt, dass der Grad der Oligomerisierung konzentrationsabhängig ist (Manting, van Der Does et al. 2000; Scheuring, Braun et al. 2005). Zudem ist vorstellbar, dass die Natur der hydrophoben Umgebung (Detergenz, Lipide, native Membranen) einen Einfluss auf den Oligomerisierungsgrad hat. Letztlich ist denkbar, dass die Anzahl der im aktiven Translokons beteiligten Bausteine in den verschiedenen Spezies (*E. coli*, *S. cerevisiae*, *Mammalia*) unterschiedlich ist. Allerdings ist es sehr schwierig zu unterscheiden, ob die beobachteten PCC-Oligomere wirklich physiologisch bedeutsam sind oder ob es sich um Präparationsartefakte handelt.

Auf die Frage nach dem biologischen Sinn der Oligomerisierung gibt es bislang nur Spekulationen. Eine Möglichkeit wäre die Rekrutierung von weiteren Komponenten des Translokons, wie im Falle von Bakterien YidC, oder bei höheren Eukaryoten TRAM und TRAP, sowie SPC und OST (Van den Berg, Clemons et al. 2004). Allerdings wäre dies kein zwingender Grund für eine Oligomerisierung und effiziente Rekrutierung ebenso mit einem Monomer denkbar. Einen offensichtlichen funktionalen Vorteil, insbesondere bei der Insertion von Membranproteinen, hätte eine oligomere Anordnung, wenn dadurch eine größere Pore zur Akkommodation von TM-Helices entstünde. Bei allen bisher vorgestellten molekularen Modellen (geöffnetes *front-to-front*-Dimer, *back-to-back*-Dimer, Dimer aus *back-to-back*-Dimern) ist dies jedoch nicht der Fall.

4.3 Substrate zum Studium der Integration von Membranproteinen

Ein erster Schritt zur Visualisierung von ribosomenassoziierten Insertionsintermediaten konnte in dieser Arbeit getan werden. Zwei unterschiedliche experimentelle Ansätze sollten dazu führen, programmierte Ribosomen mit einer wachsenden Polypeptidkette eines polytopischen Membranproteins, die in den PCC insertiert ist, zu reinigen.

Zunächst wurde das so genannte *HAC*-System getestet, das *in vivo* zum Translationsstopp des Transkriptionsfaktors Hac1p führt (Cox and Walter 1996). Es wurden Fusions-Konstrukte aus den für den Stopp verantwortlichen Sequenzen der *HAC*-mRNA und trunkierter mRNA, die für die ersten 90 Aminosäuren von DPAP-B codiert, hergestellt. Im IVT-System aus Hefe konnte gezeigt werden, dass die HAC-Kassette zum Stopp der Translation führt und dass die naszierende Kette nach dem Stopp nicht vom Ribosom dissoziiert (Abb.35).

Folglich könnte die HAC-Kassette geeignet sein, um *in vivo* die Translation von trunkierter polytopischer Membranproteine, beispielsweise des ABC-Transporters Ste6p, am Ribosom zu stoppen. Nach kotranslationaler Insertion könnte man auf diesem Wege über einen Tag in der naszierenden Kette Insertionsintermediate reinigen.

Ein alternativer Ansatz ist es, die kotranslationale Integration komplett *in vitro* durchzuführen. Dazu wurden in dieser Arbeit Opsinsubstrate verschiedener Längen konstruiert und im Weizenkeim-IVT-System getestet. Die Translationsbedingungen wurden für das Ops146-Substrat so optimiert, dass die Reinigung von Ops146-RNCs möglich war (Abb. 36). Es sollen nun Experimente zur kotranslationalen Integration der naszierenden Opsinketten folgen. Dazu kann man die IVT in Anwesenheit von Pankreas-Membranen und SRP durchführen und dann versuchen, getaggte Insertionsintermediate zu reinigen. Vorversuche haben ergeben, dass dabei die Effizienz der Translation durch die Zugabe von PK-RM (mit Puromycin und 500 mM KOAc gewaschener Pankreas-Membranen) die Translationseffizienz erheblich senkt (Daten nicht gezeigt). Alternativ zu nativen Membranen können auch rekonstituierte Proteoliposomen, die Sec61 und SRP-Rezeptor (SR) enthalten zugegeben werden. Eine weitere Möglichkeit ist die *in vitro* Rekonstitution von gereinigten RNCs in Anwesenheit von SRP und Sec61-SR-Proteoliposomen.

4.4 Ausblick

4.4.1 Verbesserung der Auflösung des RNC-Sec61-Komplexes aus Hefe

In dieser Arbeit konnte nicht nur die Auflösung für das Ribosom, sondern auch für den PCC im Vergleich zur Struktur von 2001 stark verbessert werden, jedoch ist sie bislang noch nicht ausreichend für eine eindeutige Interpretation auf molekularer Ebene. Dafür können mehrere Gründe aufgeführt werden. Eine Gefahr bei der *in vitro* Rekonstitution von RNCs und PCC ist eine nicht-spezifische Interaktion des Sec61-Komplexes mit dem Ribosom oder der naszierenden Kette, da hier die natürliche Zielsteuerung der Signalsequenz an den PCC über SRP und SR ausgespart wird. Obwohl Bindungsstudien und Proteaseprotektions-Experimente auf eine produktive Interaktion zwischen RNC und Sec61 hinweisen, kann nicht völlig ausgeschlossen werden, dass der PCC teilweise unspezifisch bindet. Des Weiteren ist der PCC ein sehr dynamisches Molekül, das eine Signalsequenz erkennt und daraufhin entweder vertikal oder lateral öffnen muss. Deshalb ist es möglich, dass der PCC intrinsisch flexibel ist und in verschiedenen Konformationen vorliegt. Dennoch zeigt die Dichte des PCC eindeutige strukturelle Merkmale wie die Pore oder definierte Verbindungen zu dem Ribosom. Dies lässt den Schluss zu, dass zumindest ein großer Anteil des gebundenen Sec61-Komplexes in einheitlicher Konformation an den RNC gebunden hat. Um in naher Zukunft eine hochaufgelöste Struktur des Hefe-PCC rekonstruieren zu können, wird versucht, die Auflösung des sortierten Datensatzes weiterhin zu verbessern. Hier wurde bereits eine Auflösung von 9,5 Å erreicht (Stand November 2005). Weiterhin muss versucht werden, die Sortierung auf Selektion von Partikeln hin zu optimieren, die eine spezifische Interaktion zwischen Sec61 und dem RNC zeigen, was jedoch praktisch nicht trivial ist.

4.4.2 Alternative Methoden, die Struktur des PCC zu lösen

Zusätzlich zu weiteren Bemühungen, die Auflösung des Hefe-RNC-Sec61-Komplexes zu verbessern und eine homogene Probe zu bekommen, wurde nach alternativen Systemen gesucht, um stabile Ribosomen-Sec61- (SecYEG-)Komplexe zu generieren. Als Alternative zu trimerem Sec61-Komplex könnte der Ssh1p-Komplex (*Sec61 homolog*) verwendet werden, der einen alternativen PCC ausschließlich bei der kotranslationalen Translokation in Hefe darstellt und daher Ribosomen binden kann (Finke, Plath et al. 1996).

Eine weitere Alternative bietet die Verwendung von gereinigtem Sec61-Komplex aus *Mammalia*, mit dem Hybridkomplexe mit Hefe-, Weizenkeim- oder auch Retikulozyten-RNCs denkbar wären.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein Hybridkomplex aus Weizenkeim-RNCs mit naszierender Opsin-Kette mit gereinigtem Hefe-Sec61-Komplex rekonstituiert (Abb.37). Weizenkeim-RNC-SRP-Komplexe konnten in der Arbeitsgruppe bis zu einer Auflösung von 7 Å rekonstruiert werden (Halic, nicht publizierte Daten). Deshalb besteht die Möglichkeit, dass mit dem Weizenkeim-RNC-Sec61-Komplex eine ähnliche Auflösung erreichbar ist. Zudem ist ES27 in diesen Komplexen, im Vergleich zu Rekonstruktionen des Hefe-Ribosom, größtenteils delokalisiert. Die Ops146-RNC-Sec61-Probe ist obendrein sehr interessant, weil vermutet wird, dass die naszierende Opsinkette sich im Peptid-Exit-Tunnel zu α -helikaler Sekundärstruktur falten kann. Die Ops146-RNC-Sec61-Probe befindet sich momentan schon in der 3D-Rekonstruktion und es konnte bereits eine Auflösung unter 10 Å erreicht werden. Eine sehr präliminäre Interpretation der Kanaldichte lässt auch hier nur ein Monomer im aktiven Zustand zu (Daten nicht gezeigt).

Ein weiteres zum Hefe- und Weizenkeimsystem alternatives System ist das *E. coli*-System. Eine 3D-Rekonstruktion des RNC-SecYEG-Komplexes aus *E.coli* wurde bereits veröffentlicht (Mitra, Schaffitzel et al. 2005) (Abb. 13, d-f). Jedoch ist hier die Auflösung auch zu gering (bei 15 Å), um eine zuverlässige Interpretation der SecYEG-Dichte auf molekularer Ebene zu erlauben. Deshalb sollen *E. coli*-RNCs mit einer Signalsequenz für kotranslationale Translokation hergestellt, *in vitro* mit SecYEG rekonstituiert und eine Kryo-EM-Datensatz aufgenommen werden. Des Weiteren kann auch versucht werden, ein Translokationssystem aus einem thermophilen Organismus zu verwenden. Möglicherweise ist die Bindung von SecY ans Ribosom aus einem solchen Organismus weniger flexibel und gestattet eine höhere lokale Auflösung für den PCC.

Mit Hilfe dieser verschiedenen Ansätze sollte es in der Zukunft möglich sein, eine hochaufgelöste Struktur des ribosomengebundenen PCC zu ermitteln und auf molekularer Ebene zu interpretieren, um seine Funktionsweise bei der kotranslationalen Translokation zu verstehen und damit auch ein Vergleichsmodell für strukturelle Studien bei der Membraninsertion von TM-Domänen polytopischer Membranproteine zu liefern.

Danksagung

Ich möchte besonders Herrn Dr. Roland Beckmann für die Möglichkeit, diese Arbeit durchzuführen, sowie für eine optimale Betreuung und ständige, aktive Unterstützung bei der Arbeit danken.

Herrn Prof. Dr. Klötzel möchte ich für die Möglichkeit danken, meine Doktorarbeit am Institut für Biochemie der Charité, Berlin durchzuführen und Herrn Prof. Herrmann dafür, diese zu betreuen.

Großer Dank geht an alle Mitarbeiter der Arbeitsgruppe von Dr. Roland Beckmann, vor allem Dr. Mario Halic für Unterstützung bei LINUX-Problemen, Mikroskopie und Datenverarbeitung.

Ein herzliches Dankeschön geht ebenfalls an Herrn Prof. Christian M.T. Spahn (Institut für Medizinische Physik und Biophysik, Charité Berlin) für wertvolle Beiträge und wissenschaftliche Diskussionen zur Interpretation der Funktion von eEF3.

Ein besonderer Dank gilt Dr. Joachim Frank am Wadsworth Center in Albany, New York, für die Möglichkeit der Datensammlung am Tecnai F30 Polara Mikroskop und Robert Grassucci für viel praktische Unterstützung bei der Handhabung des Mikroskops. Dr. Kakoli Mitra danke ich für spannende wissenschaftliche Diskussionen und für die Überlassung des *front-to-front*-Modells für den SecYEG-Komplex.

Prof. Gregers Rom Andersen und Christian Folsted Andersen vom Zentrum für Strukturbiologie an der Universität Aarhus gebührt ein herzlicher Dank für die hervorragende Kooperation zum Thema eEF3.

Dr. Oliver Ernst und I. Halama möchte ich für die Bereitstellung von Plasmiden zur Generierung von Opsin- bzw. Hac1p-Konstrukten danken.

Des Weiteren geht ein herzlicher Dank an Dr. Thorsten Mielke und Justus Loerke vom UltraStrukturNetzwerk am Max-Planck-Institut für molekulare Genetik für praktische Tips am Mikroskop und LINUX-Cluster sowie Rudi Lurz und Gerhild Lüder für auflockernde Diskussionen sowie Kaffee und Kuchen während endlosen Sitzungen am Mikroskop.

Ein herzliches Dankeschön geht zudem an Dr. Cordula Enekel und deren Mitarbeiter/innen, vor allem Andrea Lehmann für Hilfestellungen bei der Anzucht von Hefen, sowie für anregende Diskussionsrunden bei Mittagessen und Dienstags-Frühstück.

Jan „Oidium“ Petersen danke ich für Hilfestellung beim Layout.

Lebenslauf

Persönliche Angaben

Name: Thomas Becker
Adresse: Blücherstr. 66d
10691 Berlin
Geburtstag: 30. November 1974
Geburtsort: Böblingen, Deutschland
Familienstand: ledig

Ausbildung

Seit August 2001 Promotion Dr. rer. nat. im Labor von Dr. Roland Beckmann
Institut für Biochemie, Charité
Humboldt University Berlin
2000 - 2001 Diplomarbeit am Lehrstuhl für Biopolymere (Prof. Rösch)
Universität Bayreuth
Titel: Die Struktur des the Nun(20-44)-Peptid-NutboxB-RNA-Komplexes
1995 - 2001 Studium der Biochemie (Diplom)
Universität Bayreuth
Abschluss mit Note „gut“ (1,52)
1994 - 1995 Zivildienst
Eberhard-Karls Universität Tübingen, Abteilung Neurologie;
Arbeit im Pflegedienst
1985-1994 Abitur am Andrae-Gymnasium Herrenberg
Abschluss mit Note 1,5

Kurse und Auslandsaufenthalte

August 2002 EMBO-Praxiskurs zum Thema Kryo-Elektronenmikroskopie
und dreidimensionaler Bildverarbeitung am EMBL Heidelberg
Februar 2003, April 2004, September 2004 Datensammlung am Polara TECNAI F30-Mikroskop in der
Arbeitsgruppe von Dr. Joachim Frank (Albany NY, Wadsworth Center,
HHMI)

Publikationsliste

Becker T, Andersen CF, Blau M, Halic M, Mielke T, Spahn CM, Andersen G, Beckmann R
Elongation factor eEF3 uses a novel ribosomal binding site to facilitate release of tRNA from the E-site.

Submitted to **Nature**

Halic M, Becker T, Pool MR, Spahn CM, Grassucci RA, Frank J, Beckmann R
Structure of the signal recognition particle interacting with the elongation arrested ribosome.
Nature. (2004) Feb 26;427(6977): 808-14.

Blau M, Mullapudi S, Becker T, Dudek J, Zimmermann R, Penczek PA, Beckmann R.
ERj1p uses a universal ribosomal adaptor site to coordinate the 80S ribosome at the membrane.
Nat Struct Mol Biol. (2005) Oct 23

Halic M, Becker T, Frank J, Spahn CM, Beckmann R.
Localization and dynamic behavior of ribosomal protein L30e.
Nat Struct Mol Biol. (2005) May;12(5):467-8.

C. Faber, M. Schärpf, T. Becker, H. Sticht, P. Rösch
The structure of the coliphage HK022 Nun protein-lambda-phage boxB RNA complex.
Implications for the mechanism of transcription termination.
J. Biol.Chem. (2001) 276(34):32064-32070.

Poster

Becker T, Halic M, Frank J, Beckmann R
High resolution cryo-EM structure of the yeast Sec61-ribosome nascent chain complex
Präsentiert auf der Gordon Research Conference on Protein Transport Across Cell Membranes (2005)

Becker T, Halic M, Frank J, Beckmann R.
High resolution cryo-EM structure of the yeast Sec61-ribosome nascent chain complex.
Präsentiert auf der EMBO Conference on Structures in Biology (2004)

Halic M, Becker T, Frank J, Spahn CM, Beckmann R

High resolution Cryo-EM structure of the SRP-RNC complex

Präsentiert auf der EMBO Conference on Structures in Biology (2004)

Blau M, Becker T, Mullapudi S, Dudek J, Penczek P, Zimmermann R, Beckmann R

Kryo-EM des proteinleitenden Kanals (1), der heptamere Sec-Komplex aus Hefe, (2)
Insertion des polytopischen Membranproteins Opsin (3)

Präsentiert im Rahmen des SFB449 (Struktur und Funktion membranständiger Rezeptoren)
(2004)

Eidstattliche Erklärung:

Hiermit erkläre ich, die Dissertation selbständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt zu haben.

Literaturverzeichnis

- Agrawal, R. K., C. M. Spahn, et al. (2000). "Visualization of tRNA movements on the Escherichia coli 70S ribosome during the elongation cycle." J Cell Biol **150**(3): 447-60.
- Andersen, C. F., M. Anand, et al. (2004). "Purification and crystallization of the yeast translation elongation factor eEF3." Acta Crystallogr D Biol Crystallogr **60**(Pt 7): 1304-7.
- Andrade, M. A., C. Petosa, et al. (2001). "Comparison of ARM and HEAT protein repeats." J Mol Biol **309**(1): 1-18.
- Beckmann, R., D. Bubeck, et al. (1997). "Alignment of conduits for the nascent polypeptide chain in the ribosome-Sec61 complex." Science **278**(5346): 2123-6.
- Beckmann, R., C. M. Spahn, et al. (2001). "Architecture of the protein-conducting channel associated with the translating 80S ribosome." Cell **107**(3): 361-72.
- Bessonneau, P., V. Besson, et al. (2002). "The SecYEG preprotein translocation channel is a conformationally dynamic and dimeric structure." Embo J **21**(5): 995-1003.
- Blobel, G. (1980). "Intracellular protein topogenesis." Proc Natl Acad Sci U S A **77**(3): 1496-500.
- Blobel, G. and D. Sabatini (1971). "Ribosome-membrane interaction in eucaryotic cells." Biomembranes: 193-195.
- Borel, A. C. and S. M. Simon (1996). "Biogenesis of polytopic membrane proteins: membrane segments of P-glycoprotein sequentially translocate to span the ER membrane." Biochemistry **35**(33): 10587-94.
- Breyton, C., W. Haase, et al. (2002). "Three-dimensional structure of the bacterial protein-translocation complex SecYEG." Nature **418**(6898): 662-5.
- Cannon, K. S., E. Or, et al. (2005). "Disulfide bridge formation between SecY and a translocating polypeptide localizes the translocation pore to the center of SecY." J Cell Biol **169**(2): 219-25.
- Collinson, I., C. Breyton, et al. (2001). "Projection structure and oligomeric properties of a bacterial core protein translocase." Embo J **20**(10): 2462-71.
- Cox, J. S. and P. Walter (1996). "A novel mechanism for regulating activity of a transcription factor that controls the unfolded protein response." Cell **87**(3): 391-404.
- Crowley, K. S., S. Liao, et al. (1994). "Secretory proteins move through the endoplasmic reticulum membrane via an aqueous, gated pore." Cell **78**(3): 461-71.
- Crowley, K. S., G. D. Reinhart, et al. (1993). "The signal sequence moves through a ribosomal tunnel into a noncytoplasmic aqueous environment at the ER membrane early in translocation." Cell **73**(6): 1101-15.
- Dasmahapatra, B. and K. Chakraborty (1981). "Protein synthesis in yeast. I. Purification and properties of elongation factor 3 from Saccharomyces cerevisiae." J Biol Chem **256**(19): 9999-10004.
- Do, H., D. Falcone, et al. (1996). "The cotranslational integration of membrane proteins into the phospholipid bilayer is a multistep process." Cell **85**(3): 369-78.
- Dong, J., R. Lai, et al. (2004). "The essential ATP-binding cassette protein RLI1 functions in translation by promoting preinitiation complex assembly." J Biol Chem **279**(40): 42157-68. Epub 2004 Jul 23.
- Dubochet, J., A. W. McDowell, et al. (1983). "Electron microscopy of frozen-hydrated bacteria." J Bacteriol **155**(1): 381-90.
- Duong, F. (2003). "Binding, activation and dissociation of the dimeric SecA ATPase at the dimeric SecYEG translocase." Embo J **22**(17): 4375-84.

- Finke, K., K. Plath, et al. (1996). "A second trimeric complex containing homologs of the Sec61p complex functions in protein transport across the ER membrane of *S. cerevisiae*." Embo J **15**(7): 1482-94.
- Francois, B., R. J. Russell, et al. (2005). "Crystal structures of complexes between aminoglycosides and decoding A site oligonucleotides: role of the number of rings and positive charges in the specific binding leading to miscoding." Nucleic Acids Res **33**(17): 5677-90. Print 2005.
- Frank, J. and R. K. Agrawal (2000). "A ratchet-like inter-subunit reorganization of the ribosome during translocation." Nature **406**(6793): 318-22.
- Frank, J., M. Radermacher, et al. (1996). "SPIDER and WEB: processing and visualization of images in 3D electron microscopy and related fields." J Struct Biol **116**(1): 190-9.
- Friedlander, M. and G. Blobel (1985). "Bovine opsin has more than one signal sequence." Nature **318**(6044): 338-43.
- Gerbi, S. A. (1996). "Expansion segments: regions of variable size that interrupt the universal core secondary structure of ribosomal RNA." Ribosomal RNA, Structure, Evolution, Processing, and Function in Protein Biosynthesis(Zimmermann, R. A. & Dahlberg, A. E., eds, CRC Press, New York): 71-87.
- Gilmore, R. and G. Blobel (1985). "Translocation of secretory proteins across the microsomal membrane occurs through an environment accessible to aqueous perturbants." Cell **42**(2): 497-505.
- Gomez-Lorenzo, M. G., C. M. Spahn, et al. (2000). "Three-dimensional cryo-electron microscopy localization of EF2 in the *Saccharomyces cerevisiae* 80S ribosome at 17.5 Å resolution." Embo J **19**(11): 2710-8.
- Gontarek, R. R., H. Li, et al. (1998). "The N terminus of eukaryotic translation elongation factor 3 interacts with 18 S rRNA and 80 S ribosomes." J Biol Chem **273**(17): 10249-52.
- Gonzalez, T. N., C. Sidrauski, et al. (1999). "Mechanism of non-spliceosomal mRNA splicing in the unfolded protein response pathway." Embo J **18**(11): 3119-32.
- Gorlich, D. and T. A. Rapoport (1993). "Protein translocation into proteoliposomes reconstituted from purified components of the endoplasmic reticulum membrane." Cell **75**(4): 615-30.
- Halic, M., T. Becker, et al. (2004). "Structure of the signal recognition particle interacting with the elongation-arrested ribosome." Nature **427**(6977): 808-14.
- Hamman, B. D., J. C. Chen, et al. (1997). "The aqueous pore through the translocon has a diameter of 40-60 Å during cotranslational protein translocation at the ER membrane." Cell **89**(4): 535-44.
- Hamman, B. D., L. M. Hendershot, et al. (1998). "BiP maintains the permeability barrier of the ER membrane by sealing the luminal end of the translocon pore before and early in translocation." Cell **92**(6): 747-58.
- Hanein, D., K. E. Matlack, et al. (1996). "Oligomeric rings of the Sec61p complex induced by ligands required for protein translocation." Cell **87**(4): 721-32.
- Harms, J., F. Schlutzen, et al. (2001). "High resolution structure of the large ribosomal subunit from a mesophilic eubacterium." Cell **107**(5): 679-88.
- Harris, C. R. and T. J. Silhavy (1999). "Mapping an interface of SecY (PrlA) and SecE (PrlG) by using synthetic phenotypes and in vivo cross-linking." J Bacteriol **181**(11): 3438-44.
- Hartmann, E., D. Gorlich, et al. (1993). "A tetrameric complex of membrane proteins in the endoplasmic reticulum." Eur J Biochem **214**(2): 375-81.
- Hausner, T. P., U. Geigenmuller, et al. (1988). "The allosteric three-site model for the ribosomal elongation cycle. New insights into the inhibition mechanisms of aminoglycosides, thiostrepton, and viomycin." J Biol Chem **263**(26): 13103-11.

- Heinemeyer, W., N. Trondle, et al. (1994). "PRE5 and PRE6, the last missing genes encoding 20S proteasome subunits from yeast? Indication for a set of 14 different subunits in the eukaryotic proteasome core." Biochemistry **33**(40): 12229-37.
- Heinrich, S. U., W. Mothes, et al. (2000). "The Sec61p complex mediates the integration of a membrane protein by allowing lipid partitioning of the transmembrane domain." Cell **102**(2): 233-44.
- Heinrich, S. U. and T. A. Rapoport (2003). "Cooperation of transmembrane segments during the integration of a double-spanning protein into the ER membrane." Embo J **22**(14): 3654-63.
- Higgins, C. F. and K. J. Linton (2004). "The ATP switch model for ABC transporters." Nat Struct Mol Biol **11**(10): 918-26.
- Hoffman, K. E. and R. Gilmore (1988). "Guanosine triphosphate promotes the post-translational integration of opsin into the endoplasmic reticulum membrane." J Biol Chem **263**(9): 4381-5.
- Hopfner, K. P., A. Karcher, et al. (2000). "Structural biology of Rad50 ATPase: ATP-driven conformational control in DNA double-strand break repair and the ABC-ATPase superfamily." Cell **101**(7): 789-800.
- Hopfner, K. P. and J. A. Tainer (2003). "Rad50/SMC proteins and ABC transporters: unifying concepts from high-resolution structures." Curr Opin Struct Biol **13**(2): 249-55.
- Johnson, A. E. and M. A. van Waes (1999). "The translocon: a dynamic gateway at the ER membrane." Annu Rev Cell Dev Biol **15**: 799-842.
- Jones, T. A., J. Y. Zou, et al. (1991). "Improved methods for building protein models in electron density maps and the location of errors in these models." Acta Crystallogr A **47**(Pt 2): 110-9.
- Jungnickel, B. and T. A. Rapoport (1995). "A posttargeting signal sequence recognition event in the endoplasmic reticulum membrane." Cell **82**(2): 261-70.
- Kalies, K. U., D. Gorlich, et al. (1994). "Binding of ribosomes to the rough endoplasmic reticulum mediated by the Sec61p-complex." J Cell Biol **126**(4): 925-34.
- Kamath, A. and K. Chakraborty (1989). "Role of yeast elongation factor 3 in the elongation cycle." J Biol Chem **264**(26): 15423-8.
- Kambampati, R. and K. Chakraborty (1997). "Functional subdomains of yeast elongation factor 3. Localization of ribosome-binding domain." J Biol Chem **272**(10): 6377-81.
- Kambampati, R., C. Pellegrino, et al. (2000). "Limited proteolysis of yeast elongation factor 3. Sequence and location of the subdomains." J Biol Chem **275**(22): 16963-8.
- Karcher, A., K. Buttner, et al. (2005). "X-ray structure of RLI, an essential twin cassette ABC ATPase involved in ribosome biogenesis and HIV capsid assembly." Structure (Camb) **13**(4): 649-59.
- Kaushal, S., K. D. Ridge, et al. (1994). "Structure and function in rhodopsin: the role of asparagine-linked glycosylation." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(9): 4024-8.
- Kovalchuk, O., R. Kambampati, et al. (1998). "Competition and cooperation amongst yeast elongation factors." Eur J Biochem **258**(3): 986-93.
- Kowarik, M., S. Kung, et al. (2002). "Protein folding during cotranslational translocation in the endoplasmic reticulum." Mol Cell **10**(4): 769-78.
- Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." Nature **227**(5259): 680-5.
- Lepault, J., F. P. Booy, et al. (1983). "Electron microscopy of frozen biological suspensions." J Microsc **129**(Pt 1): 89-102.
- Locher, K. P. (2004). "Structure and mechanism of ABC transporters." Curr Opin Struct Biol **14**(4): 426-31.

- Locher, K. P. and E. Borths (2004). "ABC transporter architecture and mechanism: implications from the crystal structures of BtuCD and BtuF." FEBS Lett **564**(3): 264-8.
- Locher, K. P., A. T. Lee, et al. (2002). "The E. coli BtuCD structure: a framework for ABC transporter architecture and mechanism." Science **296**(5570): 1091-8.
- Lu, J. and C. Deutsch (2005). "Folding zones inside the ribosomal exit tunnel." Nat Struct Mol Biol **20**: 20.
- Manting, E. H., C. van Der Does, et al. (2000). "SecYEG assembles into a tetramer to form the active protein translocation channel." Embo J **19**(5): 852-61.
- Martoglio, B., M. W. Hofmann, et al. (1995). "The protein-conducting channel in the membrane of the endoplasmic reticulum is open laterally toward the lipid bilayer." Cell **81**(2): 207-14.
- Marton, M. J., D. Crouch, et al. (1993). "GCN1, a translational activator of GCN4 in *Saccharomyces cerevisiae*, is required for phosphorylation of eukaryotic translation initiation factor 2 by protein kinase GCN2." Mol Cell Biol **13**(6): 3541-56.
- Marton, M. J., C. R. Vazquez de Aldana, et al. (1997). "Evidence that GCN1 and GCN20, translational regulators of GCN4, function on elongating ribosomes in activation of eIF2 α kinase GCN2." Mol Cell Biol **17**(8): 4474-89.
- Menetret, J., A. Neuhoof, et al. (2000). "The structure of ribosome-channel complexes engaged in protein translocation." Mol Cell **6**(5): 1219-32.
- Menetret, J. F., R. S. Hegde, et al. (2005). "Architecture of the ribosome-channel complex derived from native membranes." J Mol Biol **348**(2): 445-57.
- Mindell, J. A. and N. Grigorieff (2003). "Accurate determination of local defocus and specimen tilt in electron microscopy." J Struct Biol **142**(3): 334-47.
- Mitra, K., C. Schaffitzel, et al. (2005). "Structure of the E. coli protein-conducting channel bound to a translating ribosome." Nature **438**(7066): 318-24.
- Moazed, D. and H. F. Noller (1987). "Interaction of antibiotics with functional sites in 16S ribosomal RNA." Nature **327**(6121): 389-94.
- Morgan, D. G., J. F. Menetret, et al. (2002). "Structure of the mammalian ribosome-channel complex at 17A resolution." J Mol Biol **324**(4): 871-86.
- Mothes, W., S. Prehn, et al. (1994). "Systematic probing of the environment of a translocating secretory protein during translocation through the ER membrane." Embo J **13**(17): 3973-82.
- Mueller, F., T. Doring, et al. (1995). "Getting closer to an understanding of the three-dimensional structure of ribosomal RNA." Biochem Cell Biol **73**(11-12): 767-73.
- Nielsen, P. R., D. Nietlispach, et al. (2005). "Structure of the chromo barrel domain from the MOF acetyltransferase." J Biol Chem **280**(37): 32326-31. Epub 2005 Jun 17.
- Ogle, J. M. and V. Ramakrishnan (2004). "Structural Insights into Translational Fidelity." Annu Rev Biochem **19**: 19.
- Okada, T., O. P. Ernst, et al. (2001). "Activation of rhodopsin: new insights from structural and biochemical studies." Trends Biochem Sci **26**(5): 318-24.
- Osborne, A. R., T. A. Rapoport, et al. (2005). "Protein Translocation by the Sec61/Secy Channel." Annu Rev Cell Dev Biol **21**: 529-550.
- Panzner, S., L. Dreier, et al. (1995). "Posttranslational protein transport in yeast reconstituted with a purified complex of Sec proteins and Kar2p." Cell **81**(4): 561-70.
- Pettersen, E. F., T. D. Goddard, et al. (2004). "UCSF Chimera--a visualization system for exploratory research and analysis." J Comput Chem **25**(13): 1605-12.
- Plath, K., W. Mothes, et al. (1998). "Signal sequence recognition in posttranslational protein transport across the yeast ER membrane." Cell **94**(6): 795-807.
- Ridge, K. D., S. S. Lee, et al. (1996). "Examining rhodopsin folding and assembly through expression of polypeptide fragments." J Biol Chem **271**(13): 7860-7.

- Ridge, K. D., S. S. Lee, et al. (1995). "In vivo assembly of rhodopsin from expressed polypeptide fragments." *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**(8): 3204-8.
- Robinson, H., Y. G. Gao, et al. (1998). "The hyperthermophile chromosomal protein Sac7d sharply kinks DNA." *Nature* **392**(6672): 202-5.
- Roseman, A. M. (2003). "Particle finding in electron micrographs using a fast local correlation algorithm." *Ultramicroscopy* **94**(3-4): 225-36.
- Ruegsegger, U., J. H. Leber, et al. (2001). "Block of HAC1 mRNA translation by long-range base pairing is released by cytoplasmic splicing upon induction of the unfolded protein response." *Cell* **107**(1): 103-14.
- Sabatini, D. D., G. Kreibich, et al. (1982). "Mechanisms for the incorporation of proteins in membranes and organelles." *J Cell Biol* **92**(1): 1-22.
- Scheuring, J., N. Braun, et al. (2005). "The Oligomeric Distribution of SecYEG is Altered by SecA and Translocation Ligands." *J Mol Biol* **7**: 7.
- Scotti, P. A., M. L. Urbanus, et al. (2000). "YidC, the Escherichia coli homologue of mitochondrial Oxa1p, is a component of the Sec translocase." *Embo J* **19**(4): 542-9.
- Simon, S. M. and G. Blobel (1991). "A protein-conducting channel in the endoplasmic reticulum." *Cell* **65**(3): 371-80.
- Skogerson, L. (1979). "Separation and characterization of yeast elongation factors." *Methods Enzymol* **60**: 676-85.
- Spahn, C. M., R. Beckmann, et al. (2001). "Structure of the 80S ribosome from Saccharomyces cerevisiae--tRNA-ribosome and subunit-subunit interactions." *Cell* **107**(3): 373-86.
- Spahn, C. M., M. G. Gomez-Lorenzo, et al. (2004). "Domain movements of elongation factor eEF2 and the eukaryotic 80S ribosome facilitate tRNA translocation." *Embo J* **23**(5): 1008-19. Epub 2004 Feb 19.
- Stark, H., M. V. Rodnina, et al. (1997). "Visualization of elongation factor Tu on the Escherichia coli ribosome." *Nature* **389**(6649): 403-6.
- Stark, H., M. V. Rodnina, et al. (2002). "Ribosome interactions of aminoacyl-tRNA and elongation factor Tu in the codon-recognition complex
Visualization of elongation factor Tu on the Escherichia coli ribosome." *Nat Struct Biol* **9**(11): 849-54.
- Stein, A. J., G. Fuchs, et al. (2005). "Structural insights into RNA quality control: the Ro autoantigen binds misfolded RNAs via its central cavity." *Cell* **121**(4): 529-39.
- Triana-Alonso, F. J., K. Chakraborty, et al. (1995). "The elongation factor 3 unique in higher fungi and essential for protein biosynthesis is an E site factor." *J Biol Chem* **270**(35): 20473-8.
- Tyzack, J. K., X. Wang, et al. (2000). "ABC50 interacts with eukaryotic initiation factor 2 and associates with the ribosome in an ATP-dependent manner." *J Biol Chem* **275**(44): 34131-9.
- Uritani, M. and M. Miyazaki (1988). "Characterization of the ATPase and GTPase activities of elongation factor 3 (EF-3) purified from yeasts." *J Biochem (Tokyo)* **103**(3): 522-30.
- Uritani, M. and M. Miyazaki (1988). "Role of yeast peptide elongation factor 3 (EF-3) at the AA-tRNA binding step." *J Biochem (Tokyo)* **104**(1): 118-26.
- Valle, M., J. Sengupta, et al. (2002). "Cryo-EM reveals an active role for aminoacyl-tRNA in the accommodation process." *Embo J* **21**(13): 3557-67.
- Valle, M., A. Zavialov, et al. (2003). "Incorporation of aminoacyl-tRNA into the ribosome as seen by cryo-electron microscopy." *Nat Struct Biol* **10**(11): 899-906. Epub 2003 Oct 19.
- Valle, M., A. Zavialov, et al. (2003). "Locking and unlocking of ribosomal motions." *Cell* **114**(1): 123-34.

- Van den Berg, B., W. M. Clemons, Jr., et al. (2004). "X-ray structure of a protein-conducting channel." Nature **427**(6969): 36-44. Epub 2003 Dec 3.
- Vazquez de Aldana, C. R., M. J. Marton, et al. (1995). "GCN20, a novel ATP binding cassette protein, and GCN1 reside in a complex that mediates activation of the eIF-2 alpha kinase GCN2 in amino acid-starved cells." Embo J **14**(13): 3184-99.
- Voigt, S., B. Jungnickel, et al. (1996). "Signal sequence-dependent function of the TRAM protein during early phases of protein transport across the endoplasmic reticulum membrane." J Cell Biol **134**(1): 25-35.
- Wagenknecht, T., R. Grassucci, et al. (1988). "Electron microscopy and computer image averaging of ice-embedded large ribosomal subunits from Escherichia coli." J Mol Biol **199**(1): 137-47.
- Waters, M. G. and G. Blobel (1986). "Secretory protein translocation in a yeast cell-free system can occur posttranslationally and requires ATP hydrolysis." J Cell Biol **102**(5): 1543-50.
- Wilson, D. N., G. Blaha, et al. (2002). "Protein synthesis at atomic resolution: mechanistics of translation in the light of highly resolved structures for the ribosome." Curr Protein Pept Sci **3**(1): 1-53.
- Wimberly, B. T., D. E. Brodersen, et al. (2000). "Structure of the 30S ribosomal subunit." Nature **407**(6802): 327-39.
- Woolhead, C. A., P. J. McCormick, et al. (2004). "Nascent membrane and secretory proteins differ in FRET-detected folding far inside the ribosome and in their exposure to ribosomal proteins." Cell **116**(5): 725-36.
- Yahr, T. L. and W. T. Wickner (2000). "Evaluating the oligomeric state of SecYEG in preprotein translocase." Embo J **19**(16): 4393-401.
- Yuan, Y. R., S. Blecker, et al. (2001). "The crystal structure of the MJ0796 ATP-binding cassette. Implications for the structural consequences of ATP hydrolysis in the active site of an ABC transporter." J Biol Chem **276**(34): 32313-21. Epub 2001 Jun 11.
- Yusupov, M. M., G. Z. Yusupova, et al. (2001). "Crystal structure of the ribosome at 5.5 A resolution." Science **292**(5518): 883-96. Epub 2001 Mar 29.
- Zavialov, A. V., V. V. Hauryliuk, et al. (2005). "Guanine-nucleotide exchange on ribosome-bound elongation factor G initiates the translocation of tRNAs." J Biol **4**(2): 9. Epub 2005 Jun 27.